

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

**Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* Sorogrupo C,  
Grande São Paulo, 1990 a 2003**

Ana Paula Silva de Lemos

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

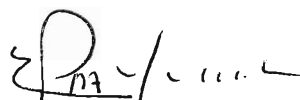
Orientador:  
Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

São Paulo  
2005

Ana Paula Silva de Lemos

**Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* Sorogrupo C,  
Grande São Paulo, 1990 a 2003**

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor



Prof. Dra. Elsa Masae Mamizuka  
orientadora/presidente

Prof. Dra. Irene Soares

---

1º. examinador

Prof. Dra Adelaide José Vaz

---

2º. examinador

Prof. Dr. Carmo Elias A. Melles

---

3º. examinador

Prof. Dra. Maria Cristina C. Brandileone

---

4º. examinador

São Paulo, 23 de Setembro de 2005.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Relatório de Defesa**

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Ana Paula Silva de Lemos no Programa: Farmácia (Análise Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de setembro de 2005, no(a) Auditório Bloco 13 A realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Ana Paula Silva de Lemos, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Farmácia - Área: Análises Clínicas, intitulada:

"Descrição de um novo clone de 'Neisseria meningitidis' sorogrupo C, Grande São Paulo, 1990 a 2003"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Elsa Masae Mamizuka	Presidente	FCF	Aprovada
Irene da Silva Soares	Suplente	FCF	Aprovada
Carmo Elias Andrade Melles	Titular	Docente Externo	Aprovado
Adelaide Jose Vaz	Titular	FCF	aprovada
Maria Cristina de Cunto Brandileone	Titular	Docente Externo	aprovada

Resultado Final: **APROVADA**

Parecer da Comissão Julgadora \*

A candidata apresentou ótima dicção, mostrando muita segurança. Respondeu a todas as questões formuladas pela banca com muita propriedade.  
Consideramos a candidata aprovada.

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Sueli Providelo Sueli Providelo, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 23 dias do mês de setembro de 2005.

Irene da Silva Soares  
Irene da Silva Soares

Carmo Elias Andrade Melles  
Carmo Elias Andrade Melles

Adelaide Jose Vaz  
Adelaide Jose Vaz

Maria Cristina de Cunto Brandileone  
Maria Cristina de Cunto Brandileone

Elsa Masae Mamizuka  
Elsa Masae Mamizuka  
Orientador(a)

Comissão de Pós-Graduação  
HOMOLOGADO  
26 SET. 2005  
Sueli Providelo  
Presidente

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

**Este trabalho foi desenvolvido no**  
**Instituto Adolfo Lutz Central - Centro de Referência Nacional para Meningites**  
**Seção de Bacteriologia - Setor de Bactérias Piogênicas e Toxigênicas**



*“É possível balizar a História através de grandes idéias. Ou é possível balizar a História por eventos econômicos. Ou pela luta de classe. Mas é possível balizar a História por meio de doenças que acometeram grandes grupos populacionais : as epidemias”*

*Moacir Scliar*

*Aos meus pais,*

## *Agradecimentos,*

*Ao Dr Carmo Elias Melles pelo aceite inicial como orientador da minha tese de doutorado*

*Dra Maria Cecília Gorla pelo apoio, pelas valiosas sugestões e correções, e orientação nos experimentos na clivagem química de proteína*

*Dra Elsa Masae Mamizuka pela orientação recebida na elaboração desta tese*

*Teresa Yara pelo valioso auxílio técnico e preciosa colaboração*

*Dr Claudio Sacchi pela colaboração científica ao longo destes anos*

*Dra Angela Brandão pelas sugestões dadas a este trabalho*

*Dra Martha Tanizaki, pela cessão do laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan para o experimento de clivagem química de proteína*

*À Banca examinadora da Qualificação da tese. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adelaide Vaz e Dr<sup>a</sup> Mirthes Ueda pelos comentários, correções e sugestões*

*Dra Maria Cristina Brandileone e Dra Vera Simonsen pelo constante apoio à realização deste trabalho na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz*

*Aos companheiros Vaneide de Paiva, Adriana Lambert, Glória do Valle, Rosemeire Zanella, Silvana Casagrande, Sérgio Bokermann, Luiza Guerra, Samantha de Almeida da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração dessa tese.*

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS .....	
LISTA DE TABELAS .....	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Agente Etiológico.....	2
1.2 Estrutura Antigênica de <i>N. meningitidis</i> .....	3
1.2.1 Cápsula .....	5
1.2.2 Membrana externa.....	7
1.2.2.1 Proteína .....	7
1.2.2.2 Lipooligossacarídeo .....	9
1.2.3 Pili .....	10
1.3 Patogênese de <i>N. meningitidis</i> .....	10
1.4 Caracterização de <i>N. meningitidis</i> .....	12
1.4.1 Caracterização Fenotípica .....	12
1.4.1.1 Sorogrupagem .....	12
1.4.1.2 Sorotipagem .....	13
1.4.2 Caracterização Genotípica .....	14
1.4.2.1 Tipagem de Regiões Variáveis das proteínas PorA e PorB.....	14
1.5 Marcadores Epidemiológicos.....	19
1.6 Genética Populacional e Epidemiologia da <i>N. meningitidis</i> .....	24
1.7 Epidemiologia da <i>N. meningitidis</i> na Grande São Paulo.....	33
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1 Cepas de <i>Neisseria meningitidis</i></b> .....	42
<b>3.2 Sorotipagem</b> .....	42
3.2.1 Preparo das suspensões bacterianas e das membranas de nitrocelulose para a tipagem .....	42
3.2.2 Painel de anticorpos monoclonais empregados na tipagem das cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	43
3.2.3 Técnica de sorotipagem das cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> por dot- blotting .....	44
<b>3.3 Extração de Vesículas de Membrana Externa (VMEs)</b> .....	46
<b>3.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</b> .....	47
<b>3.5 Immunoblotting</b> .....	48
<b>3.6 Eluição de proteína de classe 1 (PorA)</b> .....	48
<b>3.7 Clivagem da proteína de classe 1 (PorA) pelo brometo de cianogênio (CNBr)</b> .....	49
<b>3.8 Produção dos Anticorpos Monoclonais (MAbs) específicos para as proteínas da cepa N753/00</b> .....	50
3.8.1 Imunização dos camundongos.....	50
3.8.2 Fusão Celular .....	51
3.8.3 Clonagem das células híbridas .....	53
3.8.4 Manutenção Celular.....	54
3.8.5 Produção de Líquido Ascítico.....	54
3.8.6 Criopreservação das Células .....	55
3.8.7 Isotipagem dos Anticorpos Monoclonais.....	55
<b>3.9 Análise dos genes <i>porA</i>, <i>porB</i> e 16S RNA ribossomal</b> .....	56
3.9.1 Amplificação dos genes <i>porA</i> e <i>porB</i> e 16S RNA ribossomal.....	56
3.9.2 Seqüenciamento dos genes <i>porA</i> , <i>porB</i> e 16S .....	57
3.9.3 Números de Acesso ao Genbank.....	58

3.10 Meios de Cultura e Soluções .....	63
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
4.1 Caracterização das VMEs da cepa N.753/00, representativa do novo fenótipo C:NST:NSST circulante na Grande São Paulo.....	71
4.2 Caracterização dos Anticorpos Monoclonais .....	72
4.2.1 Linhagem celular F29-8H11/1E11 .....	74
4.2.2 Determinação do epítipo reconhecido pelo MAb F29-8H11/1E11 .....	74
4.2.3 Linhagem celular F29-1G1/1B4.....	76
4.2.4 Confirmação da presença da VR3-23.....	76
4.3 Caracterização das cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> C por meio da técnica de <i>Dot Blotting</i> com os MAbs 23 e P1.14-6 .....	77
4.4 Expressão das proteínas PorA em SDS-PAGE e Tipagem das Regiões Variáveis da proteína PorA.....	80
4.5 Estudo da diversidade genética entre as cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> C pela tipagem do gene 16S rRNA .....	81
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>7. RESUMO .....</b>	<b>104</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>106</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>125</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
bp	“Base pairs”
C.I.	Coeficiente de incidência
cm	centímetro
CNBr	Brometo de Cianogênio
cnl	“capsule null locus”
CRNM	Centro de Referência Nacional para Meningites
DM	Doença Meningocócica
DO	Densidade ótica
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
dNTP	“2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphate”
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
ET	“Electrophoretic Type”
g	grama
GSP	Grande São Paulo
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IgG	Imunoglobulina G
KDa	KiloDalton
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-octanato
L	Litro
LOS	Lipooligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo

M	Molar
MAB	Anticorpo monoclonal
MEE	“Multilocus Enzyme Electrophoresis”
MLST	“Multilocus sequence typing”
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
MLDF	“Multilocus DNA fingerprinting”
MLRT	“Multilocus restriction typing”
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
mM	Milimolar
MPF	Meio Pós-Fusão
N	Normal
NIBSC	“National Institute for Biological Standards and Control”
NIH	“National Institute of Health”
NIPH	“National Institute for Public Health”
nm	nanômetro
NAcGlc	N-acetil-glicosamina
ng	nanograma
nm	nanômetro
NST	não sorotipável
NSST	não soro-subtipável
OMP	“Outer Membrane Protein”
Opa	“Opacity associated protein”
Opc	“Outer membrane protein class 5 precursor”
OPI	Oxaloacetato + piruvato + insulina bovina
ORF	“open reading frame”



PAGE	“Polyacrylamide gel electrophoresis”
PBS	“Phosphate buffered saline”
PBP	“protein binding penicillin”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis”
pH	Potencial de hidrogênio
PorA	Porina A
PorB	Porina B
Rb	Ribotipo
mp	“reduction modifiable protein”
rpm	rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
SDS	“Sodium dodecyl sulphate”
SFB	soro fetal bovino
SPRIA	“solid-phase radioimmunoassay”
ST	“sequence type”
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	“N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine”
TSA	“Tryptic Soy Agar”
TSB	“Tryptic Soy Broth”
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade
VME	Vesículas de membrana externa
VR	“Variable Region”
WRAIR	“Walter Reed Army Medical Center”

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 Estrutura antigênica da <i>Neisseria meningitidis</i> (ROSENSTEIN ET AL., 2001) .....	4
FIGURA 2 Modelo estrutural da proteína de classe 1 (PorA). (VAN DER LEY ET AL., 1991) .....	17
FIGURA 3 Modelo estrutural da proteína de classe 2 (PorB). (VAN DER LEY ET AL., 1991) .....	18
FIGURA 4 Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12% da VME da cepa N.753/00 .....	71
FIGURA 5 Especificidade dos MAbs secretados pelas linhagens celulares híbridas, aos antígenos da VME da cepa N.753/00.....	73
FIGURA 6 Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12% da proteína PorA da cepa N.753/00 clivada pelo brometo de cianogênio (CNBr) e sua reatividade com o Mab secretado pela linhagem F29-8H11/1E11 .....	75
FIGURA 7 Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida a 12%, de cepas NSST apresentando diferentes níveis de expressão da proteína de classe 1 (PorA). ...	81
FIGURA 8 Dendrograma filogenético construído com os cinco tipos do gene 16S RNA ribossomal de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	88
GRÁFICO 1 Distribuição dos fenótipos prevalentes de cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> C isolados na Grande São Paulo de 1990 a 2003 .....	37
GRÁFICO 2 Percentual de cepas C:23:P1.14-6 em relação às cepas previamente caracterizadas como C:NST:NSST isoladas na Grande São Paulo de 1990 a 2003 .....	78
GRÁFICO 3 Distribuição dos fenótipos prevalentes de cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> C isoladas na Grande São Paulo de 1990 a 2003 após a introdução dos MAbs para o sorotipo 23 e sorosubtipo P1.14-6 .....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Estrutura química dos antígenos capsulares diferenciadores dos sorogrupos de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	6
TABELA 2 Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene <i>porA</i> .....	60
TABELA 3 Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene <i>porB</i> .....	61
TABELA 4 Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene 16S RNA ribossomal.....	62
TABELA 5 Sorotipos e soro-subtipos das cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> C isoladas de 1990 a 2003 na Grande São Paulo .....	36
TABELA 6 Características dos tipos das regiões variáveis da proteína PorB de <i>Neisseria meningitidis</i> e a reatividade com o MAb da linhagem celular F29-1G1/1B4.....	76
TABELA 7 Caracterização de 62 cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> quanto ao sorogrupo, sorotipo, soro-subtipo, tipo de PorA e tipo de 16S associados ao número de acesso ao GenBank.....	83
TABELA 8 Tipos de 16S entre as 62 cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> analisadas pelo seqüenciamento do gene 16S RNA ribossomal.....	85

## **1. INTRODUÇÃO**

A doença meningocócica (DM) é conhecida desde 1805, quando Vieussex descreveu uma epidemia de febre cerebrospinal em Genebra - Suíça e até hoje continua sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A DM ainda permanece como uma das mais temidas infecções em função de sua rápida progressão e tendência em causar surtos e epidemias (POOLMAN, 1995).

Seu potencial epidêmico pode ser ilustrado pela ocorrência de diversas epidemias, principalmente após o início do século XX (PELTOLA et al., 1982). Nessa doença, a letalidade pode atingir até 70% nas formas graves, sendo comum a ocorrência de seqüelas (MOORE, 1992). Esses aspectos a caracterizam como um importante problema de saúde pública.

### **1.1 Agente Etiológico**

O agente etiológico da DM foi identificado pela primeira vez em 1887, por Anton Weichselbaum e posteriormente foi denominado *Neisseria meningitidis*, também conhecido como meningococo (DeVOE, 1992).

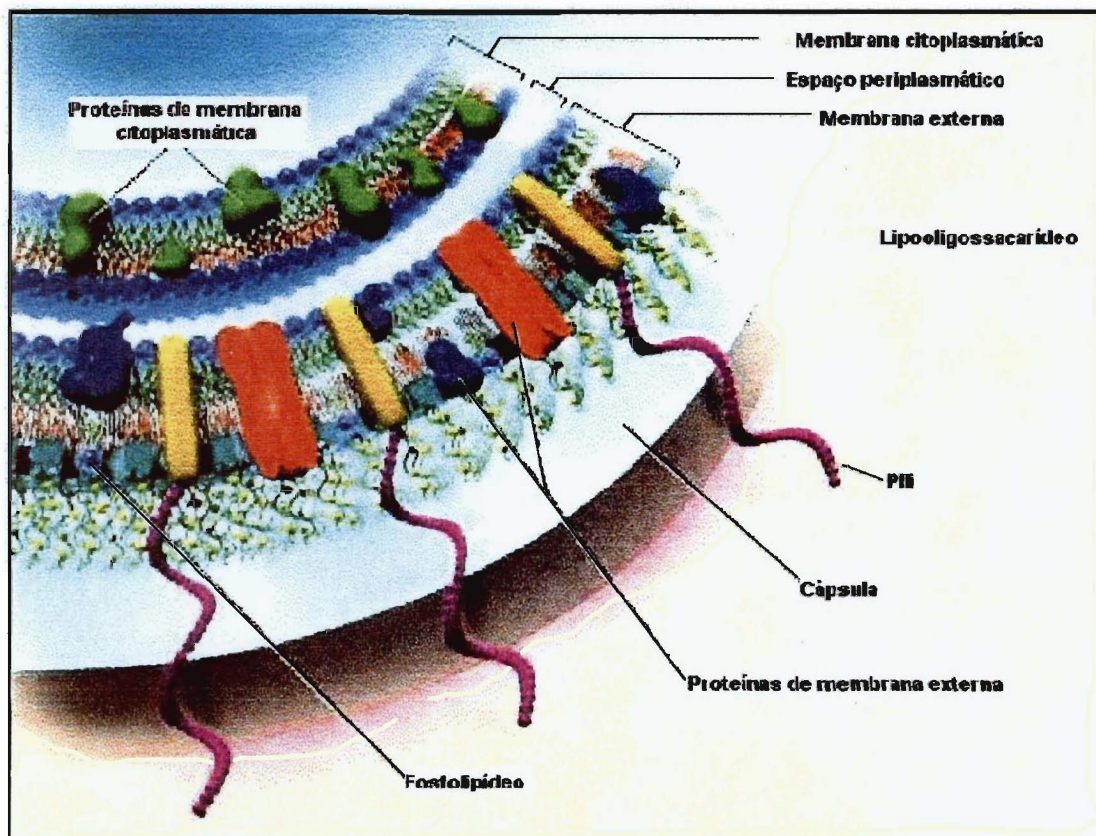
*N. meningitidis* pertencente à família Neisseriaceae, gênero Neisseria, espécie meningitidis, se apresenta na forma de cocos (0.6 - 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro), geralmente aos pares, com aspecto riniforme e são Gram -negativos. Possuem cápsula e fímbrias. Os meningococos não formam endósporos e são imóveis. O processo de respiração é aeróbio, apresentando as reações de oxidase e catalase positivas. Seu metabolismo é do tipo heterotrófico, requerendo sais minerais, lactato, alguns aminoácidos e ácido glutâmico como fontes de carbono. A cistina é requerida por aproximadamente 10% das cepas, sendo que algumas podem utilizar

sais de amônio como a única fonte de nitrogênio (Bjune et al., 1991). A seqüência completa do genoma da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (MC 58) mostrou que este microorganismo se compõe de 2,2 mega pares de bases, com uma média de 51,5% de G + C. O genoma contém quatro operons que dirigem a síntese do RNA ribossomal (rRNA) e 59 RNAs transportadores (tRNA), com especificidade para todos os 20 aminoácidos. Foram identificadas 2.158 ORFs (fase aberta de leitura) e destas, 1.158 ORFs (53,7%) codificam funções gênicas já determinadas, como a obtenção de energia a partir da glicose e maltose (TETTELIN et al., 2000).

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento do meningococo a partir de amostras não contaminadas, como líquido cefalorraquidiano e sangue, é o ágar sangue ou chocolate, tendo como base o ágar Muller-Hinton ou outro similar. Para materiais biológicos originários de sítios contaminados como nasofaringe deve-se empregar meios seletivos, tal como o Thayer-Martin. A temperatura ótima de crescimento é de 36 - 37°C. Dióxido de carbono (3-10%) e umidade (50%) favorecem o crescimento (MORELLO et al., 1991).

## **1.2 Estrutura Antigênica de *N. meningitidis***

A superfície do meningococo revela uma estrutura típica de envelope celular das bactérias Gram negativas. O envelope é composto de membrana citoplasmática, camada de peptídeoglicano e membrana externa. A membrana externa é constituída de lipopolissacarídeo (LPS) e de uma bicamada fosfolipídica, na qual as proteínas de membrana externa (OMPs) estão inseridas. As cepas patogênicas isoladas de infecções sistêmicas têm a membrana externa circundada por uma cápsula polissacarídica (ROSENSTEIN et al., 2001). Figura 1



**FIGURA 1.** Visão do corte transversal da membrana celular do meningococo (Trad. ROSENSTEIN et al., 2001)

### 1.2.1 Cápsula

A cápsula do meningococo consiste de um polissacarídeo aniônico de alto peso molecular e sua natureza imunoquímica é a base para classificação dos meningococos em diversos sorogrupos, Tabela 1. São descritos 12 sorogrupos até o momento: A, B, C, W135, 29E, H, I, K, L, X, Y, Z (FRASCH et al., 1985; DeVOE, 1992).

Há divergência na bibliografia consultada quanto ao número total de sorogrupos, dada pela inclusão ou não do meningococo do sorogrupo D. Segundo FRASCH, citado por RIOU et al., 1980, as características das cepas deste sorogrupo não são suficientes para individualizá-lo como um grupo. VEDROS, 1984 refere no "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", ser o meningococo D raro na população. ZOLLINGER em 1990, refere 13 sorogrupos, entretanto, ressalta, que o sorogrupo D não está bem definido quanto à sua composição química e estrutural.



**TABELA 1** Estrutura química dos antígenos capsulares diferenciadores dos sorogrupos de *Neisseria meningitidis*

Soro-grupo	Unidade repetitiva do polissacarídeo	Ligação	Localização O-acetil
A	$\rightarrow 6)$ - $\alpha$ -D-Man $\rho$ Nac-(1-PO <sub>4</sub> $\rightarrow$	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)	C-3 manosamine
B	$\rightarrow 8)$ - $\alpha$ -D-NeupNac-(2 $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)	Ausente
C	$\rightarrow 9)$ - $\alpha$ -D-NeupNac-(2 $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 9)	C-7 e C-8 do ácido siálico
W135	$\rightarrow 6)$ - $\alpha$ - D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-NeupNac-(2 $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)	Ausente
29E	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -D-GalpNac-(1 $\rightarrow$ 7)- $\beta$ -D-KDO $\rho$ -(2 $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)	C-4 e C-5 do KDO
L	$\rightarrow 3)$ - N,N',N''-tri-Ac-Glcp-(1-P O <sub>4</sub> $\rightarrow$	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)	Ausente
X	$\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -D-GlcpNac-(1-PO <sub>4</sub> $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)	ausente
Y	$\rightarrow 6)$ - $\alpha$ - D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-NeupNac-2 $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)	C3, C4 da Glcp e C7 do ácido siálico
Z	$\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -D-GalpNac-(1 $\rightarrow$ 1')-glicerol-(3PO <sub>4</sub> $\rightarrow$	$\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)	ausente
H	$\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)-glicerol-(3-PO <sub>4</sub> $\rightarrow$	$\alpha$ -(3 $\rightarrow$ 4)	C2 e C3 da Galp
I	$\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -L-GluNacA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-ManNacA-(1 $\rightarrow$	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)	C4 da ManNacA
K	$\rightarrow 3)$ - $\beta$ -D-ManNacA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-ManNacA-(1 $\rightarrow$	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)	C4 da 1ª ManNacA

## 1.2.2 Membrana Externa

A membrana externa do meningococo é formada de componentes protéicos e glicolipídicos.

### 1.2.2.1 Proteína

As proteínas da membrana externa constituem a classe de estruturas superficiais de grande importância biológica. Diferenças imunológicas e estruturais entre as principais classes de proteínas permitem a subdivisão dos principais sorogrupos em sorotipos e soro-subtipos.

A caracterização das proteínas da membrana externa do meningococo, de acordo com seu peso molecular, e seu comportamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a susceptibilidade a enzimas proteolíticas e o mapeamento peptídico, resultou na diferenciação de cinco classes estruturais: classe 1, 2, 3, 4 e 5, que apresentam pesos moleculares de respectivamente, 45-47 KDa, 40-42 KDa, 37-39 KDa, 32-34 KDa e 26-29KDa, (TSAI et al., 1981).

Todas as cepas de meningococo possuem proteínas de classe 2 ou 3, também denominadas PorB. Essas classes de proteínas funcionam como poros seletivos para ânions, através dos quais os solutos hidrofílicos atravessam a membrana externa, por meio de um processo semelhante à difusão (DORSET et al., 1984; LINCH et al., 1984; MURAKAMI et al., 1989; TOMASSEN et al., 1990). As proteínas de classe 4 também denominada Rmp (*Reduction modifiable protein*), cuja função ainda é desconhecida, estão presentes em todas as cepas de meningococo e entre as cepas se mostram estruturalmente conservadas (FRASCH et al., 1986).

As proteínas da classe 1, também denominadas PorA, as proteínas da classe 5 denominadas Opa (*opacity associated protein*) e Opc (*outer membrane protein class 5 precursor*) estão presentes na maioria das cepas de meningococo. As proteínas de classe 1 funcionam como poros seletivos para cátions (DORSET et al., 1984; TOMASSEN et al., 1990). As proteínas de classe 5, ao contrário das demais, se expressam em quantidades e qualidades variáveis (FRASCH et al., 1978; FRASCH et al., 1985; FRASCH et al., 1986; WOODS et al., 1990). A proteína Opc, inicialmente denominada 5C, embora apresente algumas propriedades comuns as Opas, se distingue destas pela pouca homologia. O gene *Opc* não possui a seqüência pentamérica repetida CTCTT, que regula a translação do gene *Opa* (VIRJI et al., 1992), responsável pela codificação das proteínas Opas.

A classificação em sorotipos é baseada na antigenicidade das proteínas de classes 2 ou 3 pelas seguintes razões (POOLMAN et al., 1983; FRASCH et al., 1985):

1. Todas as cepas de meningococo apresentam uma das duas proteínas, mas não ambas; e são ditas classes excludentes.
2. São as classes de proteínas que predominam na membrana externa.
3. Não variam entre cepas relacionadas epidemiologicamente.
4. Apresentam um alto grau de variação antigênica que se mostra útil no processo de caracterização de diferentes cepas.

Além dos sorotipos, as cepas de meningococo podem ser classificadas em soro-subtipos, que são determinados por proteínas de classe 1 (PorA). Eventualmente, pode-se usar as proteínas de classe 5 para classificação adicional das cepas, mas há desvantagem de possibilitar a ocorrência de variações antigênicas dessa classe de proteína, nos diferentes isolamentos de uma mesma cepa (FRASCH et al., 1985).

### 1.2.2.2 Lipooligossacarídeo

Os glicolipídeos da membrana externa do meningococo contêm oligossacarídeos curtos de diferentes composições químicas denominados lipooligossacarídeos (LOS). Os LOS são compostos por quatro regiões (GRIFFISS et al., 1988) :

1. Lipídeo A ou glicolipídeo basal, de natureza hidrofóbica, ancorado na membrana externa e que é constituído de glicosaminil-beta-(1-6) glicosamina e ácido láurico. Essa é a região responsável pela toxicidade da molécula.
2. *Core* de oligossacarídeo que é constituído de um número variável de ácido 2-ceto -3 desoxi-D-octanato (KDO) e resíduos de heptose fosfato, onde se liga um pentassacarídeo contendo glicose, galactose e N-acetil -glicosamina (NAcGlc). As pontes glicosídicas são de configuração alfa. O *core* funciona como uma barreira a compostos hidrofóbicos, tais como, corantes, antibióticos e sais biliares.
3. Segmento de alongação que compreende um domínio entre o *core* e a seqüência terminal. Este segmento contém um número variável de resíduos de galactose e glicose ligados por configuração beta. A extensão desse comprimento é que determina o comprimento do oligossacarídeo.

As diferenças antigênicas entre os LOSs são a base para a classificação dos meningococos em imunotipos, sendo que uma bactéria pode expressar diferentes imunotipos (TSAI et al., 1987). Atualmente reconhecem-se 11 imunotipos, sendo que L1 a L9 estão associados com os sorogrupos B e C; e L10 e L11 com o sorogrupo A (SCHOLTEN et al., 1994).

### 1.2.3 Pili

São projeções filamentosas compostas por proteínas glicosiladas, ancoradas na membrana externa e expostas na superfície celular. Estruturas análogas são encontradas em *Neisseria gonorrhoeae*. O meningococo expressa duas diferentes classes de pili: classe 1 e classe 2, que são classificações de acordo com características funcionais e estruturais (CORBETT et al., 2004)

### 1.3 Patogênese

O meningococo é isolado da nasofaringe de portadores assintomáticos na frequência de 5 a 10%. São transmitidos por contato direto, por meio de secreção nasal ou oral e, também, por meio de inalação de aerossóis (TZENG et al., 2000). Na maioria das pessoas, o estado de portador é um processo de imunização (ROSENSTEIN et al., 2001) e, em menor frequência, o meningococo pode penetrar na mucosa e invadir a corrente sanguínea, causando a doença sistêmica.

O meningococo possui uma variedade de mecanismos de adaptação ao hospedeiro, que inclui variação de fase, como acontece com os polissacarídeos capsulares (SWARTLEY et al., 1997), com o pilus (SEIFERT et al., 1988) e variação antigênica, como a variação apresentada pelo LPS e pelas proteínas de classes (MURPHY, 1994)

A colonização do hospedeiro pelo meningococo se dá inicialmente pelo ataque às células epiteliais não ciliadas da nasofaringe o que, provavelmente, é mediado pela ligação do pili ao receptor CD46 e, subsequente, ligação das proteínas Opa aos receptores CD66 e das Opc, referidas como proteínas ligadoras de heparina, aos seus receptores nas células epiteliais que são as proteoglicanas

sulfato de heparina (De VRIES et al., 1998). A bactéria sofre então uma endocitose pelas células epiteliais e atinge o tecido subepitelial via vacúolos fagocíticos (ROSENSTEIN et al., 2001). Todas as cepas patogênicas de meningococo secretam uma exoenzima, a IgA1 protease que cliva a imunoglobulina IgA interferindo nas funções protetoras desse isotipo na mucosa. Além disso, os fragmentos Fab- $\alpha$  da IgA1 liberados pela clivagem, retêm a capacidade de ligar-se ao antígeno podendo bloquear o acesso de anticorpos IgG e IgM (MULKIS & PLAUT, 1978; JARVIS & GRIFFISS, 1991). Outra função biológica dessa enzima recentemente descrita refere-se à clivagem da LAMP1, uma glicoproteína presente na membrana dos lisossomos, onde se processa a degradação de material endocitado pelas células. A função da LAMP1 é desconhecida, mas acredita-se que proteja a membrana dos lisossomos da digestão por hidrolases; sua clivagem teria um efeito negativo na função dos lisossomos, favorecendo a sobrevivência da bactéria dentro das células epiteliais (AYALA et al., 1998). Durante a multiplicação e lise bacteriana podem ser liberadas as estruturas de membrana externa, na forma de vesículas, também chamadas de *blebs*, contendo importantes fatores de virulência como : proteínas, lipídeos, polissacarídeo capsular e grande quantidade de LOS (25 a 50% em relação às proteínas) (DeVOE & GILCHRIST, 1973). O LPS desempenha papel importante na entrada da bactéria nas células da mucosa e na sua sobrevivência após a invasão da corrente sanguínea, por se tornarem resistentes a anticorpos ou ao sistema complemento, por meio de mecanismos de escape como a sialização de sua molécula (ESTABROOK et al., 1997). As proteínas de membrana externa, como as captadoras de ferro, são consideradas importantes fatores de virulência, pois durante a infecção a bactéria encontra um ambiente restrito de ferro livre. Estas proteínas favorecem a utilização do ferro, essencial para a sua sobrevivência (ROSENSTEIN et al., 2001). A cápsula possui propriedades antifagocíticas e antibactericidas e assim como constitui importante

fator de virulência, contribuindo para a sobrevivência do meningococo durante a invasão na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano.(ROSENSTEIN et al., 2001). Estudos clínicos e epidemiológicos têm evidenciado a função da cápsula na patogênese (TZENG et al., 2000). As cepas isoladas de portadores tendem a ser não capsuladas conforme discutido pelo estudo realizado com 860 cepas de *N.meningitidis* isoladas de portadores, onde ficou demonstrado que 136 cepas (16,4%) não possuíam os operons para o transporte do polissacarídeo capsular. Estes operons estavam substituídos por uma região intergênica sem função codificadora, nomeada como *cnl* (*capsule null locus*),(CLAUS et al., 2002).

## **1.4 Caracterização de *N. meningitidis***

### **1.4.1 Caracterização Fenotípica**

#### **1.4.1.1 Sorogrupagem**

A sorogrupagem é baseada nas diferenças dos polissacarídeos capsulares. Os sorogrupos são identificados pelas técnicas de soroaglutinação (VEDROS, 1984), co-aglutinação ou empregando anticorpos monoclonais (MAbs) em técnicas de *ELISA* ou *dot-blotting* (MORELLO et al., 1991). Mais recentemente, as técnicas de biologia molecular têm sido usadas para predizer o sorogrupo. A partir da amplificação, por meio da técnica de PCR, do gene *siaD*, que codifica a polissialiltransferase, pode-se determinar os sorogrupos B, C, Y e W135 das cepas meningocócicas cujos polissacarídeos capsulares contém ácido siálico (POLARD et al., 2002; LEWIS & CLARKE, 2003). Para a determinação do sorogrupo A é utilizada a amplificação do gene *mynB*, que codifica a enzima que atua na polimerização da N-acetil-D-manosamina e alternativamente foi proposta a

amplificação do gene *orf2* para também predizer esse sorogrupo (TAHA 2000; 2002).

#### 1.4.1.2 Sorotipagem

Os estudos de classificação de *N. meningitidis* em sorotipos foram iniciados por GOLDSCHNEIDER et al., 1969 e GOLD & WYLE, 1970 utilizando ensaios bactericidas. FRASCH & CHAPMAN, 1972a relataram um esquema de sorotipagem baseado na especificidade de anticorpos bactericidas. Posteriormente esses mesmos autores descreveram os sorotipos utilizando técnicas de precipitação com antígenos específicos extraídos com solução salina ou soluções de ácidos fracos (FRASCH et al., 1972b).

ZOLLINGER e MANDRELL, 1977 introduziram o uso do teste de inibição pela técnica de radioimunoensaio (SPRIA) para a identificação dos sorotipos de meningococo.

Atualmente existe uma variedade de técnicas empregando anticorpos monoclonais (MAbs) para identificação de sorotipos e soro-subtipos, tais como soroaglutinação (ZOLLINGER et al., 1984), *dot-blotting* (WEDEGE et al., 1990), radioimunoensaio (ZOLLINGER et al., 1979; MARIE et al., 1984), *ELISA* (ABDILLAHI et al., 1987) e aglutinação em látex (WEDEGE et al., 1990).

Até o momento estão descritos 17 sorotipos e 18 soro-subtipos (SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b) A padronização do esquema de sorotipagem dos antígenos de superfície do meningococo foi feita à semelhança do esquema de tipagem de *E. coli* e Salmonella. Por conseguinte, uma cepa de *N. meningitidis* apresentando a fórmula antigênica B:4:P1.15, significa que pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4, soro-subtipo P1.15. As nomenclaturas designadas como NST e NSST significam, respectivamente, que as proteínas de sorotipo e soro-subtipo não



puderam ser caracterizadas pelo painel de anticorpos monoclonais disponível (FRASCH et al., 1985). Por exemplo: B:NST:P1.15; B:4:NSST; C:NST:NSST.

Historicamente, a tipagem das proteínas de classe tem sido definida pela reatividade com MAbs, entretanto o atual sistema de identificação dos sorotipos e soro-subtipos não é suficientemente abrangente, pois muitos isolados falham em reagir com o painel de MAbs disponível, ou seja, permanecem não soro-subtipados ou parcialmente soro-subtipados. O motivo é a falta de anticorpos monoclonais que consigam caracterizar toda a diversidade de epítomos de sorotipo e/ou soro-subtipo de *N. meningitidis* (SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b).

## **1.4.2 Caracterização Genotípica**

### **1.4.2.1 Tipagem das Regiões Variáveis das Proteínas PorA e PorB**

Com os progressos que vêm ocorrendo no campo da biologia molecular, a determinação da seqüência de nucleotídeos dos genes *porA* que codifica a proteína PorA e de *porB* que codifica a proteína PorB, têm elucidado a natureza, a estrutura, a topologia e a reatividade de epítomos de soro-subtipo e sorotipo nessas proteínas.

McGUINNESS et al., 1990 compararam as seqüências de aminoácidos de três proteínas de classe 1 de diferentes soro-subtipos e demonstraram regiões com um alto grau de homologia estrutural e duas regiões de alta variabilidade, chamadas região variável 1 (VR1) e região variável 2 (VR2), na PorA.

ZAPATA et al., 1992 comparando cinco seqüências de aminoácidos da proteína de classe 3 de diferentes sorotipos, determinaram duas regiões variáveis, VR1 e VR2. Posteriormente, FEAVERS et al., 1992a em um estudo comparando as seqüências de aminoácidos de proteínas de classe 3 em outras quatro cepas de

diferentes sorotipos descreveram duas regiões variáveis adicionais da PorB, as VR3 e VR4.

Foi proposta a construção de um modelo estrutural para PorA e PorB. A estrutura secundária bi-dimensional dessas proteínas apresenta oito alças, identificadas de I a VIII, expostas em cada uma dessas porinas. (MAIDEN et al., 1991; FEAVERS et al., 1992a; VAN DER LEY et al., 1991). A maior variabilidade em seqüência de aminoácidos entre as proteínas PorA, as chamadas VR1 e VR2, se localizam respectivamente nas alças I e IV. As proteínas PorB que apresentam quatro regiões com alto grau de variabilidade na seqüência de aminoácidos, VR1, VR2, VR3, VR4, estão localizadas respectivamente nas alças I, V, VI, VII (BUTCHER et al., 1991; FEAVERS et al., 1992a; WARD et al., 1992; ZAPATA et al., 1992; BASH et al., 1995), Figuras 2 e 3 .

Essas conclusões corroboram a idéia de que as VRs são responsáveis por epítomos de sorotipo e soro-subtipo; ou seja, a PorA possui dois epítomos independentes específicos para soro-subtipo e a PorB apresenta quatro epítomos independentes específicos para sorotipo. Pode-se dessa forma afirmar que os MAbS reconhecem seqüências mínimas definidas como epítomos localizados no ápice das alças das VRs (McGUINNESS et al., 1993).

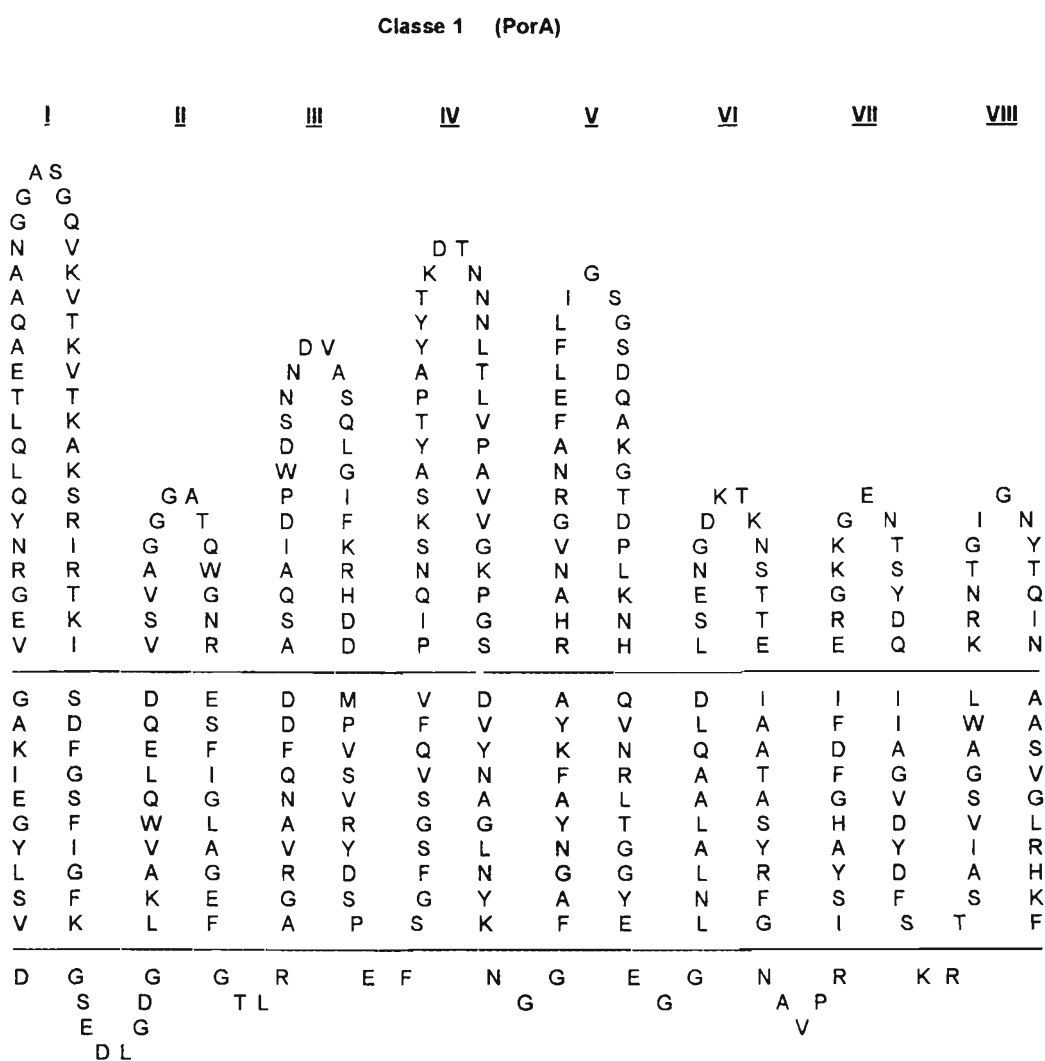
O seqüenciamento das regiões variáveis de PorB e PorA apresenta vantagens em relação a sorotipagem principalmente por determinar quatro epítomos indicadores de sorotipo e dois de soro-subtipo, o que permite a caracterização completa da cepa em estudo.

O seqüenciamento das VRs também demonstra que a variação de um único aminoácido pode abolir a reatividade com alguns MAbS, resultando em cepas não sorotipáveis e/ou não soro-subtipáveis (McGUINNESS et al., 1993). Por causa dessas observações foi proposto um esquema de tipagem baseado nas seqüências de aminoácidos das VR1, VR2, VR3 e VR4 da PorB e nas VR1 e VR2 da PorA

(SUKER et al., 1994; SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b; RUSSEL et al., 2004).

No esquema de tipagem para PorA, o sistema de nomenclatura é suficientemente flexível para acomodar todos os novos epítomos determinados a partir da análise das seqüências de nucleotídeos, assim como os epítomos já definidos pela reatividade com os MAbS. As cepas são agrupadas em famílias de VRs baseado em diferenças nas seqüências de aminoácidos das VRs. As seqüências para as quais existem MAbS disponíveis são definidas como protótipos; as seqüências que apresentarem  $\geq 80\%$  de similaridade em aminoácidos com relação ao protótipo pertencem à mesma família de VR. Essas seqüências são definidas como variantes e identificadas com um número como um sufixo após o número que identifica o soro-subtipo. Assim, por exemplo, P1.10-1, P1.10-2, P1.10-3, P1.10-4...P1.10-20 são variantes pertencentes à mesma família P1.10 (SUKER et al., 1996). O banco de dados com acesso às seqüências já determinadas (RUSSEL et al., 2004) encontra-se disponível na página <http://neisseria.org/nm/typing/pora> da *Internet*.

O esquema para tipagem da PorB utiliza letras minúsculas como sufixo para designação de variantes de uma família e utiliza letras maiúsculas para designar as VRs para as quais não existem MAbS disponíveis (SACCHI et al., 1998a). Assim, uma cepa identificada como B:4,D,7,14:P1.7,1, indica que possui o epítomo de sorotipo 4 na VR1, epítomo D na VR2, epítomo 7 na VR3 e epítomo 14 na VR4. No presente estudo foi utilizado o esquema de SUKER et al., 1994 para designação das VRs na PorA e de SACCHI et al., 1998a, para designação das VRs da PorB.



**FIGURA 2.** Modelo estrutural da proteína de classe 1 (PorA). A parte superior do modelo mostra a região exposta e a parte central, o segmento transmembrana (VAN DER LEY ET AL., 1991).



## 1.5 Marcadores Epidemiológicos

Tradicionalmente, os aspectos bioquímicos, antigênicos, os produtos de metabolismo como toxinas ou, ainda, as enzimas que codificam a resistência aos antimicrobianos, têm sido as principais características fenotípicas utilizadas na determinação de um agente infeccioso.

Ademais, os sistemas que discriminam os microorganismos dentro das espécies tipificando-os são de grande interesse nos estudos epidemiológicos. Assim, um sistema útil e eficaz de tipagem deve apresentar as seguintes características : ser reprodutível, estável, ter poder discriminatório e ser aplicável em grande número de cepas (MASLOW et al., 1993; MASLOW & MULLIGAN, 1996).

Vários procedimentos de tipagem fenotípica e genotípica são descritos para *N. meningitidis* e, a escolha do marcador a ser utilizado, depende das questões epidemiológicas a serem respondidas. A classificação fenotípica das cepas bacterianas em sorogrupo, sorotipo e soro-subtipo fornece informações importantes para tomadas de estratégias relevantes em saúde pública, como, a decisão de se fazer ou não uma intervenção vacinal na população, mas, isoladamente não é adequada para propósitos epidemiológicos, pois não reflete necessariamente a relação genética verdadeira. As técnicas moleculares de tipagem para *N. meningitidis* são as mais adequadas para os propósitos epidemiológicos, como a investigação de surtos e também para os estudos das estruturas genéticas populacionais, visando o entendimento de suas variações e evolução (YAKUBU et al., 1999).

O estudo da epidemiologia global de uma doença requer métodos que possuam a habilidade de detectar as variações genéticas que se acumularam em períodos relativamente longos. SELANDER et al., 1986 descreveram a técnica de *multilocus enzyme electrophoresis* (MEE), que quando utilizada no estudo da DM forneceu um entendimento da genética populacional e epidemiologia molecular, caracterizando cinco linhagens hipervirulentas de *N. meningitidis* dispersas ao redor do mundo, quais sejam: Complexo ET-5; Complexo ET-37; Linhagem III; Cluster A4 e Subgrupos I e III (CAUGANT, 1998). A técnica, considerada padrão ouro para *N. meningitidis*, determina a mobilidade eletroforética de uma seleção de enzimas constitutivas em gel de amido. As variações na mobilidade das enzimas são causadas por diferenças em função das substituições de aminoácidos nas seqüências polipeptídicas. O perfil alélico gerado a partir da mobilidade das enzimas determina o tipo eletroforético (ET) e corresponde ao genótipo da bactéria (SELANDER et al., 1986). Os ETs relacionados formam um complexo clonal, ou seja, as cepas que constituem um complexo clonal estão associadas geneticamente, o suficiente para serem provenientes de um ancestral comum. A técnica possui alguns inconvenientes como alto custo, trabalhosa e de difícil comparação de resultados entre laboratórios. MAIDEN et al., 1998 descreveram um método designado *multilocus sequence typing* (MLST), que seria uma modificação do MEE, com a vantagem da rapidez e simplicidade pelo seqüenciamento gênico automatizado. A técnica foi aplicada em uma coleção de 107 cepas de *N. meningitidis* bem caracterizadas pelo MEE e, originalmente, a proposta foi de seqüenciar fragmentos internos de aproximadamente 470 bp de seis genes constitutivos, sendo que a seqüência destes genes constitutivos classificaria a cepa em *sequence type* (ST). Atualmente, o esquema do MLST para *N. meningitidis* seqüencia sete genes constitutivos (*abcZ*, *adK*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*) (ENRIGHT et al., 1999; TAHA, 2002). A metodologia permite que os dados entre

diversos laboratórios sejam comparados, utilizando-se o banco de dados global que se encontra disponível na página da *Internet* <http://mlst.zoo.ox.ac.uk> e tem sido considerado uma ferramenta poderosa nos estudos populacionais, em investigação de surtos causados por *N. meningitidis* e, em estudos com portadores assintomáticos (VOGEL et al., 1998; BYGRAVES et al., 1999; FEAVERS et al., 1999; JOLLEY et al., 2000; TZANAKAKI et al., 2001; ZHU et al., 2001; JACOBSSON et al. 2003; DYET et al., 2004; GRODET et al. 2004; McELLISTREM et al. 2004; SKOCZNSKA et al., 2004; YAZDANKHAH et al., 2004).

Por outro lado, foi descrito um método para caracterização epidemiológica das cepas de *N. meningitidis* baseado no seqüenciamento de um gene essencial para a sobrevivência das células e altamente conservado durante o processo evolutivo dos procaríotos, que é o gene RNA ribossomal. SACCHI et al., 2002 descreveram que a diversidade das seqüências do gene 16S rRNA poderia ser usada como um marcador molecular para *N. meningitidis*. Foram identificados tipos de 16S intimamente associados com as linhagens hipervirulentas já muito bem definidas pelo MEE e MLST, como tipo 5 com o Subgrupo III, tipo 4 com o Complexo ET-5 e tipos 12 e 13 com o Complexo ET-37. Estes tipos se diferenciam pelos nucleotídeos nas seguintes posições do gene 16S: 179, 182, 814, 984, 1015, 1415, 1420 e 1429 (SACCHI et al., 2002). Recentemente, em uma investigação de surto de DM por *N. meningitidis* W135 ocorrido durante o Hajj, o evento islâmico anual em que ocorre a peregrinação dos muçulmanos à cidade de Meca na Arábia Saudita, realizou-se um estudo comparando-se o desempenho de 12 marcadores moleculares. Entre estes 12 marcadores, a tipagem do gene 16S mostrou maior sensibilidade (100%) e especificidade (98%) em identificar as cepas epidemiologicamente associadas ao Hajj, enquanto que somente associações entre os demais marcadores permitiram tal grau de diferenciação (MAYER et al., 2002).



Outros métodos de tipagem têm sido descritos como instrumentos importantes no monitoramento e entendimento da epidemiologia da doença, assim como no estudo da microevolução desta população bacteriana. A técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) demonstrou ser hábil em subdividir as diferentes cepas de *N. meningitidis* A pertencentes ao mesmo ET, determinado pela técnica do MEE (BYGRAVES et al., 1992), ou seja, pode identificar microvariações entre as cepas que circulam em uma mesma região geográfica (YAKUBU et al., 1999). SWAMINATHAN et al., 1996 compararam cinco métodos de tipagem em estudo com cepas pertencentes ao sorogrupo B. O MEE e PFGE demonstraram ter um alto poder de discriminação, como demonstrado anteriormente por YAKUBU et al., 1995. Os estudos de surtos pelo sorogrupo C ocorridos nos Estados Unidos, entre 1993 e 1995, empregando a técnica de PFGE originaram dados que apresentaram excelente correlação com os dados epidemiológicos (POPOVIC et al., 2001). O mesmo foi observado em estudos de surto pelo sorogrupo C e aumento de casos pelo sorogrupo Y, ocorridos em Maryland nos EUA (McELLISTREM et al., 2004).

A técnica da ribotipagem foi amplamente usada no entendimento da dinâmica da DM em várias partes do mundo. No Brasil, a ribotipagem foi aplicada para confirmação de similaridade entre as cepas pertencentes ao clone de *N. meningitidis* C, responsável por um surto na cidade de Curitiba, Paraná, em 1989-1990 (SACCHI et al., 1994), assim como para determinar o clone responsável pelo aumento dos casos de DM pelo sorogrupo C nos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, em 1992-1993 (SACCHI et al., 1995). Este marcador permitiu, também, a conclusão de que apesar da campanha de vacinação contra *N. meningitidis* B na Grande São Paulo (GSP) em 1988-1989, o clone ET-5 / Rb1 ainda era a cepa prevalente e responsável pelo aumento da incidência dos casos pelo sorogrupo B na GSP, sete anos após a campanha de imunização (SACCHI et

al., 1998c). Em estudo de caracterização de cepas de *N. meningitidis* B sorotipo 4 pode-se discriminar os diferentes clones por meio de uso adicional dos MABs de sorotipos 7 e 10 e da técnica de ribotipagem (LEMOS et al., 2001).

Outras técnicas genotípicas têm sido desenvolvidas visando a diferenciação de clones de meningococo, como por exemplo, a técnica baseada em elementos repetitivos do genoma designada como rep-PCR (reação de polimerase em cadeia de regiões palindrômicas extragênicas repetitivas do genoma) que foi desenvolvida por WOODS et al., 1994. No entanto, a técnica, apresentou –se com menor poder discriminatório do que o PFGE e MEE. Para a comparação entre as cepas isoladas de doentes e de portadores durante um surto em uma universidade, WOODS et al., 1996 desenvolveram a técnica RAPD (*random amplified polymorphism DNA*), que apresentou maior eficiência e sensibilidade na determinação da relação genética entre as cepas de meningococo do que o rep-PCR.

TAHA em 2002 descreveu a técnica do MLDF (*multilocus DNA fingerprinting*) que analisa o polimorfismo dos genes *pilA*, *pilD*, *crgA*, *regF* e *lga* digeridos por enzimas de restrição como um marcador para as cepas de *N. meningitidis*. Empregando-se as técnicas de MLST e MLDF, foi possível detectar na França, a presença de uma nova linhagem genética de meningococo sorogrupo W135, não pertencente ao clone ET- 37, que foi responsável por surtos ocorridos em várias partes do mundo após o Hajj em 2000, (TAHA et al., 2004). Mais recentemente, BENNETT et al., 2003 compararam os dados de sorotipagem de uma coleção de cepas isoladas na Irlanda com a técnica de MLST adaptada , o MLRT (*Multilocus Restriction Typing*) descrito por MULLER-GRAF et al., 1999. Essa técnica analisa o polimorfismo de sete genes constitutivos após o uso de uma enzima de restrição. O estudo demonstrou boa correlação entre os tipos de restrição, os RTs e os sorotipos e soro-subtipos obtidos pela sorotipagem. DYET et al., 2004 compararam

os resultados obtidos com as técnicas MLRT e MLST, para determinar a relação clonal entre as cepas do sorogrupo B, que causaram epidemia na Nova Zelândia, obtendo excelente correlação entre os resultados obtidos pelas referidas técnicas.

### **1.6. Genética Populacional e Epidemiologia da *N. meningitidis***

As infecções por *N. meningitidis* são associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O padrão e a frequência da doença variam entre as diferentes regiões do mundo. Em países de clima temperado, a incidência anual média da DM varia de 1 a 10 casos por 100.000 habitantes (MORLEY & POLLARD, 2002) e cerca de 5 a 10 casos por 100.000 habitantes em alguns países europeus, nas Américas e África do Sul (CAUGANT, 1998).

As epidemias causadas pelo sorogrupo A caracterizadas por um alto coeficiente de incidência na região do Sub-Sahara Africano, conhecido como o cinturão da meningite, têm apresentado caráter cíclico, ocorrendo a cada 10 anos (ZHU et al., 2001). As epidemias causadas pelo sorogrupo B e C apresentam taxas moderadas de incidência, sendo que as causadas pelo sorogrupo B instalam-se mais lentamente do que as causadas pelo sorogrupo C e tendem a permanecer em níveis acima do normal por várias décadas (LYSTAD et al., 1991; CAUGANT, 1998). Embora a quase totalidade dos relatos dos surtos e epidemias estarem associados aos sorogrupos A, B e C, em 2000 houve a disseminação global de uma cepa sorogrupo W135, associada ao Hajj (MAYER et al., 2002). Outra mudança na epidemiologia da doença foi observada nos Estados Unidos durante a década de 90, com um substancial aumento da incidência causada pelo sorogrupo Y em várias áreas do país (RACOOSIN et al., 1997; McELLISTREM et al., 2004).

O entendimento da epidemiologia da doença meningocócica está intimamente relacionado ao entendimento da biologia da população bacteriana. As observações iniciais da associação de determinados fenótipos com a doença sugeriam que as populações bacterianas eram, em geral, clonais (ORSKOV & ORSKOV, 1983). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que a população do meningococo é especialmente interessante por ser naturalmente competente para o evento de troca genética horizontal (FEIL et al., 1999, 2001; SUKER et al., 1994; MORELLI et al., 1997; LINZ et al., 2000; MAIDEN et al., 1993). As análises de seqüenciamento gênico identificaram várias estruturas de genes em mosaico, evidenciando que a troca horizontal de material genético entre o gênero *Neisseria* é intensa e exerce um papel importante na sua evolução (MAIDEN 1993). Entre esses genes apresentando estrutura em mosaico, foram descritos os genes responsáveis pelo baixo nível de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, que codificam as chamadas proteínas de ligação à penicilina, as PBPs (*protein binding penicillin*) (SPRATT et al., 1992) e os genes que codificam as proteínas de membrana externa (FEAVERS et al., 1992b).

De acordo com SMITH et al., 1993, a população do meningococo apresentaria cruzamentos ao acaso, sem qualquer impedimento, ou seja apresentaria o evento chamado panmixia (*pan*= tudo, todo; *mixis*= misturar), o que nos permitiria caracterizar a população como *panmítica*, baseada em sua habilidade em promover o evento de recombinação gênica.

Embora a estrutura do meningococo seja *panmítica*, a maioria dos isolados de surtos ou epidemias se restringe a poucos grupos genéticos, as chamadas linhagens hipervirulentas que se disseminam globalmente, apresentando uma

estrutura marcadamente clonal (CAUGANT et al., 1986; CAUGANT et al., 1987; SMITH et al., 1993; ACHTMAN, 1995; VOGEL et al., 2004).

SMITH et al. em 1993, na tentativa de conciliar a apresentação de estrutura clonal das linhagens hipervirulentas com a característica *panmítica* da população meningocócica, cunharam o termo população epidêmica para caracterizá-las. Neste modelo proposto, haveria uma super-representação temporal de alguns genótipos, as linhagens hipervirulentas, com estrutura clonal. Estas linhagens se multiplicariam rapidamente, disseminando-se e causando epidemias até que, hipoteticamente, os eventos de troca genética horizontal passassem a ocorrer com maior frequência, o que promoveria uma ruptura nessa cadeia de transmissão e, como consequência, o desaparecimento gradual desses clones em poucos anos (BART et al., 2001).

Em contraposição ao sugerido por SMITH et al. em 1993, sobre a biologia do meningococo sorogrupos A, B e C, WANG et al., 1992 demonstraram por meio de técnica de MEE, que o sorogrupo A possuía uma estrutura clonal e com limitada variabilidade gênica. Estes últimos autores descreveram que o meningococo sorogrupo A apresentaria um comportamento biológico diferente em relação aos sorogrupos B e C, sendo a troca horizontal uma ocorrência pouco freqüente. A recombinação rara do meningococo A poderia ser explicada pela composição não siálica de seu polissacarídeo capsular, o que dificultaria os eventos de recombinação gênica com os sorogrupos B, C, W135 e Y que possuem ácido siálico na sua composição polissacarídica (CAUGANT, 1998).

BART et al. em 2001 propuseram, então, para o sorogrupo A, uma estrutura populacional diferente da estrutura dos outros sorogrupos. Analisando os dados obtidos por MEE e MLST de uma extensa coleção de cepas de *N.meningitidis* A

isoladas desde 1915 de diversas partes do mundo, rejeitaram o modelo epidêmico descrito por SMITH et al., 1993 propondo a clonalidade do sorogrupo A. Os autores sugerem que as limitadas taxas de recombinação não seriam suficientes para provocar uma ruptura na clonalidade, o que promoveria a manutenção da estrutura populacional clonal por décadas.

Considerando-se a epidemiologia global da doença meningocócica, verifica-se que um número limitado de clones tem sido causador de epidemias e hiperendemias sendo eles, os complexos clonais ET-5, ET-37, Grupo A4, Linhagem III e Subgrupos I e III (CAUGANT et al., 1998).

### **Subgrupos I e III**

WANG et al. em 1992 caracterizaram as cepas de *N. meningitidis* A responsáveis por surtos ou epidemias ao redor do mundo desde a década de 60 e demonstraram a existência de nove complexos ou subgrupos entre as cepas sorogrupo A, denominados subgrupos I a IX. Dois destes subgrupos, I e III, tiveram uma disseminação global, sendo o subgrupo III responsável por três pandemias, ocorridas nos períodos de 1960 a 1980, de 1980 a aproximadamente 1990 e a terceira com início em 1993.

O primeiro isolamento do subgrupo I foi no Reino Unido em 1941 (ACHTMAN, 1995), mas durante a primeira guerra mundial houve uma série de epidemias, provavelmente causadas por um subgrupo diferente. No começo da década de 60, o subgrupo I foi identificado no Norte da África e nos países da região denominada "cinturão da meningite". Nesta mesma época disseminou-se também, pelo continente americano aonde causou epidemias no Brasil, Estados

Unidos e Canadá e na década de 70 foi também encontrado na Europa (CAUGANT, 1998). No fim da década de 70 o subgrupo I provocou epidemias na Ruanda e Nigéria (OLYHOEK et al., 1987). Em 1991, causou uma epidemia na África do Sul entre os refugiados de Moçambique e ainda, foi o clone predominante no país em 1996 (CAUGANT et al., 1998). Surtos provocados pelo subgrupo I também foram evidenciados entre os Maoris na Nova Zelândia e Austrália respectivamente nos anos 80 e 90 (WANG et al., 1992; ACHTMAN 1995).

A primeira pandemia, causada pelo subgrupo III, afetou a China em meados da década de 60, disseminando-se para o norte da Europa (Rússia e Escandinávia) em 1969 até meados da década de 70. Em 1969 causou uma epidemia no norte da Holanda que depois se disseminou pelo país (HJETLAND et al., 1996). Em 1973 foi identificado na Finlândia aonde foi responsável por uma grave epidemia. No mesmo ano foi isolado na Suécia, aonde causou DM até 1980 e em 1974–1975 causou epidemia no Brasil, aonde, na mesma época, o Complexo ET- 37 causava uma epidemia pelo sorogrupo C (OLYHOEK et al., 1987; SALIH et al., 1990).

A segunda pandemia começou na China e Nepal no início da década de 80. Em 1987, 7.000 casos de DM pelo sorogrupo A ocorreram durante uma peregrinação anual a Meca (MOORE et al., 1989). Naquela ocasião, o subgrupo III foi introduzido no continente africano juntamente com o retorno dos peregrinos à África, provocando graves epidemias dentro e fora do tradicional cinturão da meningite (MOORE et al., 1989; SALIH et al., 1990; MOORE, 1992). DM causada por este subgrupo associado ao evento de peregrinação a Meca também foram reportados nos Estados Unidos, França e Inglaterra, mas sem causar epidemias (ACHTMAN, 1995).

A terceira pandemia começou na China em 1993 e tem incluído epidemias na Mongólia, Rússia e África têm sido relatados desde 1994. Durante 1997 e 2000 foi responsável por casos de doença endêmica no Reino Unido (ZHU et al., 2001; JACOBSSON et al., 2003).

### **Complexo ET-5**

O complexo ET-5 é formado por vários ETs geneticamente relacionados. O primeiro relato de uma cepa pertencente a este complexo foi em um paciente na Noruega em 1969. Cinco anos depois, uma epidemia, por cepas pertencentes a este complexo, se instalou no país. Esse episódio demonstrou o baixo poder de transmissão do clone, pois demorou cinco anos após a introdução dessa cepa na população para que se iniciasse a epidemia. Uma similar observação foi feita no Brasil onde, embora o complexo ET-5 tenha sido identificado em 1979, a epidemia teve início apenas em 1988 (SACCHI et al., 1992). A análise do perfil enzimológico, por meio de MEE, demonstrou que 75% dos casos da epidemia da Noruega eram causados por cepas B:15:P1.7,16, pertencentes a este complexo (CAUGANT et al., 1998).

Em meados da década de 70, o complexo ET-5 foi também responsável por uma epidemia na Espanha, mas com um predomínio do fenótipo B:4:P1.19,15. No começo dos anos 80, o complexo foi responsável por uma epidemia em Cuba que se disseminou em Miami entre os imigrantes cubanos e hispânicos, assim como na Espanha, apresentando o fenótipo B:4:P1.19,15. Em 1985 esse complexo foi responsável por uma epidemia na cidade de Iquique de onde se alastrou para o resto do Chile, apresentando o fenótipo B:15:P1.3 (CAUGANT et al., 1986). Nos fins dos anos 80, uma epidemia de DM por cepas de fenótipo idêntica à cepa cubana ou seja, B:4:P1.19,15, se instalou no Brasil, e em particular na região da



Grande São Paulo, tendo sido responsável por elevada incidência da doença. No início dos anos 90, o complexo ET-5 foi também identificado na Argentina, onde foi responsável por 20% dos casos da DM e em Israel e na Austrália onde provocou vários surtos. Em 1992 e 1994, esse complexo foi responsável por um terço dos casos no Marrocos (CAUGANT, 1998).

Uma característica marcante das epidemias causadas pelo complexo ET-5 é a persistência. Por um longo período que compreendeu de 1974 a 1993, foi responsável na Catalunha, Espanha por cerca de 70% dos casos (VERDU et al., 1996); no Chile nos anos de 1994-1995 foi responsável por cerca de 75% dos casos de DM e em 1996, praticamente 27 anos após sua introdução na Noruega, ainda era responsável por cerca de 40% dos casos ocorridos naquele país (CAUGANT, 1998). Em 1993, nos estados de Oregon e Washington – EUA, foi detectado um aumento da incidência de casos de DM pelo sorogrupo B devido ao complexo ET-5, cujas cepas apresentaram a mesma composição antigênica das cepas norueguesas, ou seja, B:15:P1.7,16 (REEVERS et al., 1995; DIERMAYER et al., 1999). Interessantemente, desde 1994, nestes estados, tem sido descrito o isolamento de cepas sorogrupo C pertencentes ao complexo ET-5, levantando a suposição da ocorrência de uma substituição de cápsula de sorogrupo B por cápsula de sorogrupo C no clone circulante. De fato, SWARTLEY et al. em 1997 demonstraram que houve troca de cápsula por em virtude da conversão do gene que codifica a polimerase capsular e que este evento teria ocorrido *in vivo*. Presumivelmente, a colonização simultânea de cepas sorogrupo B e C na nasofaringe humana e a troca genética dos genes responsáveis pela biossíntese capsular por transformação ou troca alélica, teriam sido os eventos responsáveis pela mudança de tipo de cápsula. Os autores sugerem que esta seria uma estratégia da qual o meningococo ou outras bactérias capsuladas, capazes de

causar epidemia ou endemia, lançassem mão como um mecanismo de escape das defesas induzidas por vacinação ou imunidade natural.

### **Complexo ET-37**

O complexo ET-37 inclui clones relacionados geneticamente entre si, com a peculiaridade de expressarem a proteína de classe 2 (geralmente caracterizada como sorotipo 2a), embora estejam associados com sorogrupos diversos como B, C, W135 e Y.

O primeiro relato de surto causado por esse complexo ocorreu na forças armadas americanas em 1960 (BRUNDAGE & ZOLLINGER, 1987; WANG et al., 1993). No início da década de 70 foi responsável por uma epidemia causada por cepas sorogrupo C que se alastrou pelo Brasil. No fim da década de 70, causou epidemia na África do Sul, sendo representado por cepas sorogrupo B (CAUGANT et al., 1987; WANG et al., 1993), assim como casos de meningite na China (CAUGANT, 1998). Na década de 80 a maioria das cepas sorogrupo C isoladas nos Estados Unidos, Europa e em alguns países africanos pertencia ao complexo ET-37 (WANG et al., 1993). Na África, este complexo esteve associado aos sorogrupos Y e W135 (GUIBOURDENCHE et al., 1996). Em 1990, o aumento da incidência do número de casos de DM pelo sorogrupo C no Canadá esteve associado ao complexo ET-37. Curiosamente, os perfis eletroforéticos dessas cepas associadas a surtos no Canadá apresentavam uma particularidade na migração da enzima fumarase, quando comparados ao perfil das cepas pertencentes ao ET-37 (ASHTON et al., 1991). Foi estabelecido então, um novo tipo eletroforético correspondente ao perfil dessas cepas, designado ET-15, sendo considerado um clone do complexo ET-37. Na mesma década, o ET-15 também esteve associado a

surtos em regiões dos Estado Unidos (JACKSON et al., 1995), em Israel e na República Tcheca (KRIZOVA & MUSILEK 1995). Na Islândia e na Inglaterra foi responsável pela maioria dos casos de DM pelo sorogrupo C, nos anos de 1993 e 1995, respectivamente (CAUGANT, 1998). Recentemente, em 2000, o complexo ET-37 foi responsável por surtos associados ao Hajj. Nesses surtos, a responsável cepa pertence ao fenótipo W135:2a:P1.5,2 (CLAUS et al., 2001; MAYER et al., 2002).

#### **Grupo A4**

O grupo A4 tem se apresentado associado aos sorogrupos B ou C expressando proteína de classe 2, geralmente caracterizada como 2b:P1.10 ou 2b:P1.2. A primeira identificação deste grupo foi na Holanda em 1960, onde provocou epidemias a partir da segunda metade da década de 60. Nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Islândia e em muitos outros países europeus foi a linhagem causadora de DM na década de 70 e, também responsável por epidemia na Cidade do Cabo, África do Sul em 1979 (CAUGANT et al., 1987; CAUGANT et al., 1990).

No início da década de 90 o grupo A4 esteve associado ao aumento do número de casos pelo sorogrupo C no Brasil, apresentando o fenótipo C:2b:P1.3, que foi responsável por 74% dos isolados de *N. meningitidis* C de 1990 (SACCHI et al., 1992) até meados de 1996. Nesse período, este fenótipo foi responsável por surtos na cidade de Curitiba, Paraná, sendo que 72% dos isolados pertenciam ao Grupo A4 (SACCHI et al., 1994); foi também responsável pelos casos de DM nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (SACCHI et al., 1995). Na

mesma época, esteve associado a surtos na Austrália e ao aumento de número de casos por DM na Argentina (CAUGANT et al., 1990).

### **Linhagem III**

Este complexo clonal designado Linhagem III foi identificado na Holanda em 1980 e tornou-se o clone prevalente no país em 1990. Foi também isolado, mas em baixa frequência, na Islândia, Finlândia, Reino Unido, Grécia e Áustria. No início dos anos 90, um aumento da incidência da DM ocorreu na Nova Zelândia por esta linhagem associada ao fenótipo B:4:P1.4. Em 1995, mais de 70% dos isolados eram B:4:P1.4 e pertenciam a Linhagem III (CAUGANT et al., 1998; MARTIN et al., 1998). Recentemente, no fim da década de 90, uma cepa pertencente a esta linhagem foi isolada no Chile, indicando que este clone já foi introduzido no continente americano (CAUGANT, 1998).

### **1.7 Epidemiologia da *N. meningitidis* na Grande São Paulo**

A incidência da DM causada pela *N.meningitidis* C na Grande São Paulo, São Paulo, tem sido baixa desde o fim da epidemia ocorrida no período de 1971 a 1972 (SACCHI et al., 1992). Duas epidemias ocorreram concomitantemente naquele período, caracterizando um fenômeno peculiar: a primeira, durante 1971 e 1972, causada pelo sorogrupo C, tendo como responsável a linhagem hipervirulenta Complexo ET-37 (CAUGANT, 1998) e depois por uma segunda, causada pelo sorogrupo A (SACCHI et al., 1992). Em 1972, o coeficiente de incidência (C.I.) da DM atingiu 11,3/100.000 habitantes e 91% de todos os casos de DM foi causado pelo sorogrupo C. Em 1974 o C.I. atingiu índices acima de 179 casos/100.000 habitantes sendo 90% deles causados pelo sorogrupo A (MACHADO, 1976; MORAES, 1983; SACCHI et al., 1992). Após 1974, a prevalência

de ambos os sorogrupos começou a cair. No período de 1980 a 1987 os coeficientes de incidência da DM permaneceram entre 1,0 e 1,4 casos por 100.000 habitantes, sendo o sorogrupo B o mais prevalente, com poucos casos causados pelo sorogrupo C (SACCHI et al., 1992). Em 1988, o C.I. da DM começou a extrapolar o diagrama de controle, atingindo índices como 4,06 casos / 100.000 habitantes, sendo então caracterizada uma nova epidemia, causada pela linhagem hipervirulenta, complexo ET-5. O sorogrupo B foi responsável por aproximadamente 80% e 60% de todos os casos de DM ocorridos respectivamente nos períodos de 1988 a 1990 e de 1990 a 2000. Entretanto, a DM causada pelo sorogrupo C na Grande São Paulo começou a subir em 2000, quando atingiu 62,7% de todos os casos sorogrupadas em 2003 (Centro de Vigilância Alexandre Vranjac). O monitoramento dos sorotipos de cepas sorogrupo C circulantes na Grande São Paulo no período de 1976 a 1990, mostrou a mudança do fenótipo de C:2a:P1.2 (complexo ET-37) para C:2b:P1.3 (Cluster A4) no ano de 1990 (SACCHI et al., 1992). Este novo fenótipo passou a representar 74% das cepas sorogrupo C isoladas em 1990, sendo responsável a partir deste ano até meados de 1996 por vários surtos epidêmicos em todo território brasileiro (CAUGANT 1998; SACCHI et al., 1994; 1995).

Como parte das atividades do Centro de Referência Nacional para Meningites (CRNM) - Instituto Adolfo Lutz, as cepas de *Neisseria meningitidis* são soro-sorosubtipadas com objetivo de monitoramento dos fenótipos circulantes. A prevalência dos sorotipos, soro-subtipos das cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C isoladas no período de 1990 a 2003 estão apresentados na Tabela 5. Os sorotipos prevalentes foram 2b ( $n=381$ , 50,6%) e 2a ( $n=40$ , 5,3%); todos os outros sorotipos apresentaram menos que 5% de prevalência. Os soro-subtipos prevalentes foram P1.3 ( $n=277$ , 36,8%), P1.2 ( $n=39$ , 5,2%) e P1.5 ( $n=30$ , 4%); todos os outros soro-subtipos apresentaram menos que 3% de prevalência. O

fenótipo mais prevalente foi 2b:P1.3 ( $n=274$ , 36,4%); todos os outros fenótipos de sorotipos e soro-subtipos conhecidos apresentaram menos que 4% de prevalência. Das 753 cepas de *N. meningitidis* C analisadas, 103 cepas (13,7%) foram parcialmente tipáveis compreendendo os fenótipos NST:soro-subtipável ( $n=20$ ) ou sorotipável:NSST ( $n=83$ ); 255 cepas (34%) foram completamente não tipáveis, apresentando o fenótipo NST:NSST.

A distribuição anual dos fenótipos mais frequentes de cepas de *N. meningitidis* C isoladas na GSP no período de 1990 a 2003 é demonstrada no gráfico 1. As percentagens são baseadas no número total de cepas recebidas e analisadas ano a ano, durante o período. A partir do final de 1995 observou-se um declínio acentuado do fenótipo C:2b:P1.3 que era o prevalente desde o início da década de 90. Até o ano de 2001 este fenótipo praticamente deixou de circular entre as cepas sorogrupo C isoladas na Grande São Paulo. Paralelamente a este fenômeno, foi observado o crescimento vertiginoso do fenótipo C:NST:NSST que se iniciou em 1996, atingindo em 2003, índice maior do que 80% das cepas de *N. meningitidis* sorogrupo C recebidas da Grande São Paulo (Gráfico 1).

TABELA 5 SOROTIPOS E SOROSUBTIPOS DAS CEPAS DE *Neisseria meningitidis* C ISOLADAS DE 1990 A 2003 NA GRANDE SÃO PAULO

SOROTIPO	SOROSUBTIPO														Total
	P1.1	P1.2	P1.3	P1.5	P1.5,2	P1.5,10	P1.7	P1.7,1	P1.9	P1.10	P1.15	P1.19,15	P1.22-1,14	NSST	
2a		29		1	4									6	40
2b		8	274	16	3	1			13		2			64	381
4	1	1								13	2			5	22
4,1												1			1
4,7			1				1			2	12			2	18
4,10										1				1	2
4,21															1
15														1	1
19,7														1	1
19,10				1						1					2
19,14			1	1	2		2							2	7
21												1		1	2
NST	1	1	3	10	1			1	1	1	1	1	1	255	275
Total	1	39	277	30	10	1	4	1	2	14	16	16	3	338	753

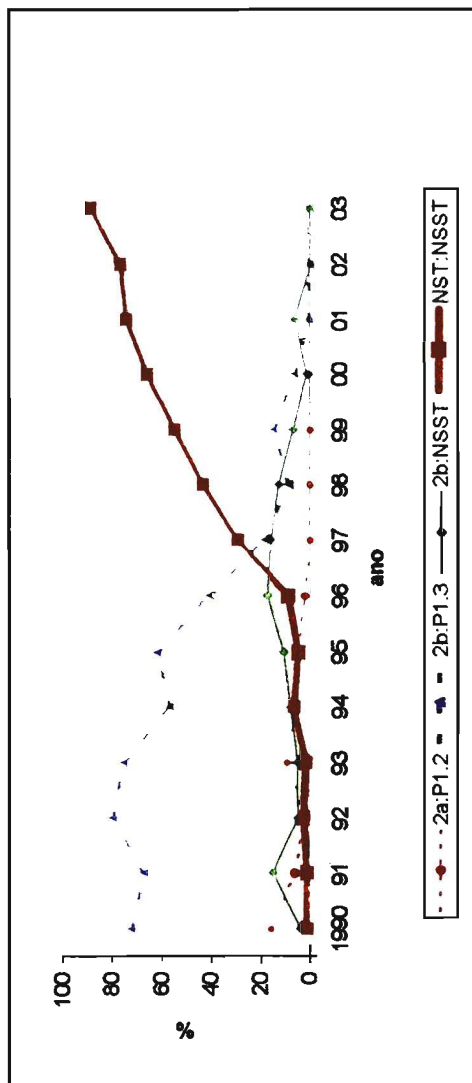


GRÁFICO 1. Distribuição dos fenótipos prevalentes de cepas de *Neisseria meningitidis* C isoladas na Grande São Paulo de 1990 a 2003.



As linhagens de meningococo com elevada capacidade de causar doença surgem periodicamente e se disseminam, algumas vezes, globalmente (ACHTMAN, 1995). Estes grupos clonais virulentos surgem e se diversificam durante a circulação na população por meio de transformação e recombinação, seleção imune e mutação. O monitoramento da população bacteriana circulante, assim como os estudos descrevendo os grupos clonais virulentos em circulação, são de grande importância no entendimento da dinâmica da DM, fornecendo as bases epidemiológicas para as estratégias de saúde pública em níveis regionais e mesmo no âmbito mundial (STEPHENS, 1999).

Considerando a histórica importância da DM pelo sorogrupo C na região da Grande São Paulo e a introdução de um novo fenótipo, C:NST:NSST, na população, o presente estudo foi desenhado para melhor entendimento da dinâmica da doença e das características dessas cepas. Foram analisadas as cepas de *Neisseria meningitidis* C isoladas no período de 1990 a 2003 por meio de sorotipagem, tipagem das VRs das proteínas PorA e PorB, e do gene 16S RNA ribossomal.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Caracterização fenotípica e genotípica das cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C não tipáveis isoladas de casos endêmicos de meningite na região da Grande São Paulo, no período de 1990 a 2003.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Produção de anticorpos monoclonais com especificidade para as proteínas de classe 1 (PorA) e 2 (PorB) das cepas de *Neisseria meningitidis* C:NST:NSST.
- ✓ Tipagem das regiões variáveis dos genes *porA* e *porB* das cepas de *Neisseria meningitidis* C por seqüenciamento.
- ✓ Tipagem do gene 16S RNA Ribossomal das cepas de *Neisseria meningitidis* de fenótipos C:NST:NSST, C:2b:P1.3, C:2a:P1.2 e C:2b:NSST.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Cepas de *Neisseria meningitidis***

As cepas de *N. meningitidis* isoladas no Brasil são enviadas pelos Laboratórios Centrais (LACEN) de cada estado ao Centro de Referência Nacional para Meningites - Instituto Adolfo Lutz, para confirmação de sorogrupo, caracterização de sorotipos e de soro-subtipos e manutenção das cepas na forma liofilizada para posteriores estudos epidemiológicos que se fizerem necessários.

Neste estudo, foram analisadas 292 cepas de *N. meningitidis*, das quais 255 C:NST:NSST, 27 C:2b:P1.3, 6 C:2b:NST e 4 C:2a:P1.2, recebidas durante os anos de 1990 a 2003 provenientes da região da Grande São Paulo.

#### **3.2 Sorotipagem**

##### **3.2.1 Preparo das suspensões bacterianas e das membranas de nitrocelulose para a tipagem**

Todas as cepas foram reativadas em ágar chocolate (item 3.10.1), base Mueller Hinton. Partindo-se deste crescimento, as cepas foram semeadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (uma cepa por placa), contendo ágar soro (item 3.10.2) preparado com base ágar soja e tripticaseína (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, EUA) enriquecido com 1% de soro de cavalo. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. A partir do crescimento em ágar soro, foram preparadas suspensões bacterianas, em tampão PBS/azida (item 3.10.3) que foram inativadas em banho-maria a 56°C por 30 minutos, conforme descrito em WEDEGE et al., 1990.

Após a inativação, a densidade ótica (DO) das suspensões foi ajustada para 0,09 a 620 nm. As suspensões foram estocadas, então, a 4°C até o momento do uso. Foram aplicados 5 µL das suspensões bacterianas das cepas testes e de cepas padrões de sorotipo e de soro-subtipo em membranas de nitrocelulose (PROTAN®) com poro de 0,45 µm que foram submetidas à secagem em temperatura ambiente e conservadas a 4°C até o momento do uso.

### **3.2.2 Painel de anticorpos monoclonais empregados na tipagem das cepas de *Neisseria meningitidis***

Os anticorpos monoclonais empregados na tipagem das cepas estão descritos e representados por sua especificidade, identificação da linhagem e origem, quadro 1.

**QUADRO 1. ESPECIFICIDADE, LINHAGEM E ORIGEM DOS MAbs UTILIZADOS NA TIPAGEM DAS CEPAS DE *Neisseria meningitidis* POR MEIO DA TÉCNICA DE DOT BLOTTING.**

Mabs	Linhagem	Fonte
2b	F1-9H10/1B3	IAL (Ana Paula Lemos & Claudio Sacchi)
4	F10-2H7/1F7	
7	F22-8B5/1D10	
9	F24-11F5/3B4	
10	F11-6D12/1C5	
P1.1	F10-5G6/1B11	
P1.4	F11-2A9/1A4	
P1.9	F24-5E11/2H9	
P1.15	F8-8F12/1D6	
P1.22-1	F4-1F1/1F3	
1	MN3C6B-95/680	NIBSC (Janet Suker)
14	MN5C8C-95/688	
21	6B11-F2-B5-95/692	
P1.5	MN22A9.19-95/702	
P1.7	MN14C11.6-95/706	
P1.10	MN20F4.17-95/710	
P1.12	MN20A7.10-95/712	
P1.14	MN21G3.17-95/716	
2a	2H10-2	NIH (Carl E. Frasch)
8	2725H6	
15	1951C8	
P1.2	1649C7	
2c	5-1-p2c	WRAIR (Wendell Zollinger)
5	7BG5-H2	
11	9-1-P11	
19	17-1-P119	
P1.3	12-1	
P1.16	3-1-P1.16	
P1.19	7A2-11	
22	ATIA5A7/5	NIPH (Paula Kriz)

**3.2.3 Técnica de sorotipagem das cepas de *Neisseria meningitidis* por meio de *dot-blotting***

As membranas de nitrocelulose, impregnadas com as cepas a serem tipadas e com cepas padrões para sorotipo e sorosubtipo, quadro 2, foram colocadas em canaletas plásticas e imersas em 2 mL de solução de bloqueio (item 3.10.4) por 30 minutos sob agitação suave. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos das fitas, os anticorpos monoclonais de sorotipo e soro-subtipo, em suas diluições

de uso, foram adicionados separadamente a cada fita. A reação foi processada por 16 horas de incubação com agitação a temperatura ambiente, após o que, seguiram-se quatro lavagens consecutivas com 4 mL de PBS (item 13.10.5) durante 4 minutos cada. A seguir, adicionou-se anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (SIGMA® A5278) na diluição de 1:3000 em solução de bloqueio e incubou-se a reação por 3 horas a temperatura ambiente com agitação suave. Seguiram-se três lavagens consecutivas com 4 mL de PBS por 4 minutos cada e uma lavagem com 4 mL de tampão acetato de sódio (item 3.10.6) por 4 minutos. Todas as lavagens foram feitas sob agitação a temperatura ambiente. As fitas foram colocadas em cubas plásticas e incubadas com 100 mL da solução reveladora (item 3.10.8) por aproximadamente 15 minutos. A reação foi interrompida lavando-se com água destilada.

**QUADRO 2. CEPAS PADRÕES PARA SOROTIPO E SOROSUBTIPO USADAS NA TIPAGEM DAS CEPAS DE *Neisseria meningitidis* POR MEIO DA TÉCNICA DE DOT BLOTTING.**

Cepa Padrão	Especificidade
M1080	sorotipos 1 e 4 e sorosubtipos P1.1 e P1.7
B16B6	sorotipo 2a e sorosubtipos P1.2 e P1.5
N.1002/90	sorotipo 2b
2396	sorotipo 2c
M992	sorotipo 5
H276	sorotipo 7 e sorosubtipo P1.10
M982	sorotipo 9 e sorosubtipo P1.9
N.34/94	sorotipo 10 e sorosubtipo P1.4
M136	sorotipo 11
S3446	sorotipo 14 e sorosubtipo P1.14
H44/76	sorotipo 15 e sorosubtipo P1.16
N.337/90	sorotipo 17 e sorosubtipo P1.22-1
M978	sorotipo 19
M1027	sorotipo 21
N.503/93	sorotipo 22
BB393	sorosubtipo P1.3
S3032	sorosubtipo P1.12
H355	sorosubtipos P1.15 e P1.19



### 3.3 Extração de Vesículas de Membrana Externa (VMEs)

Os complexos antigênicos da membrana externa (VMEs) foram extraídos da cepa N.753/00, isolada de um caso fatal ocorrido na Grande São Paulo em 2000 e, representativa do novo fenótipo C:NST:NSST, circulante na Grande São Paulo. A bactéria foi cultivada em duas placas contendo ágar soja e tripticaseína (TSA) acrescido de soro de cavalo a uma concentração final de 1% por 16-18 horas a 37°C. As células bacterianas foram, então, coletadas com auxílio de um bastão em forma de L, usando-se 5 mL de caldo TSB e com o auxílio de uma pipeta foram transferidas para um balão com 200 mL contendo caldo triptona (*Triptic Soy Broth* – TSB - DIFCO®). O meio inoculado foi incubado por 6 – 8 horas a 37°C, sob agitação de aproximadamente 120 rpm. A partir deste crescimento, foram repicados 50 mL em um balão contendo 500 mL de TSB e incubados por 16-18 horas a 37°C, sob agitação de aproximadamente 120 rpm. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 10.000 g por 20 minutos. O sedimento foi resuspenso em solução recentemente preparada de Tris 10mM pH 8.0 contendo 0,1% de inibidor de protease [10mM phenylmethylsulfonylfluoride (SIGMA P7626®) em isopropanol] e inativado em banho-maria a 56°C. As vesículas de membrana externa da bactéria foram liberadas para o meio, com auxílio de pérolas de vidro. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante coletado foi novamente centrifugado a 34.000 rpm por 75 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 1 mL de Tris 10mM pH 8.0 contendo 0,1% de inibidor de protease adicionado de 0,1 g de sarcosyl (Fluka®) e, então, centrifugado a 35.000 rpm por 75 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi dissolvido em tampão Tris10mM, pH8.0 e adicionados de azida 0,02% e glicerol 10%. O perfil protéico das VMEs foi analisado por meio de

eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie (item 3.10.12) e a dosagem de proteínas foi feita pelo método de LOWRY et al, 1951.

### **3.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), foi realizada sob condições redutoras e sistema descontínuo de tampão a 200 Volts por aproximadamente 50 minutos, empregando-se o sistema Mini-Protein II (Bio-Rad Laboratories<sup>®</sup>), como descrito por LAEMMLI, 1970. Quando a amostra a ser analisada foi a VME da cepa N.753/00, procedeu-se uma diluição a 1:2 em tampão contendo agentes redutores seguida de aquecimento a 100°C por 5 minutos. Um volume de 10 µL contendo 15 ug de proteína foi aplicado em um orifício no topo do gel de poliacrilamida a 12% e a eletroforese conduzida a 200V por 50 minutos. Após a eletroforese o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie (item 3.10.12) e desidratado em solução de metanol 50% e glicerol 0,5% a 37°C por 24 horas. Para outras amostras, também analisadas para verificação da expressão de proteínas de classe, foram preparadas as suspensões de bactérias íntegras, inativadas a 56°C por 30 minutos e ajustadas para densidade ótica de 0,900 em 540 nm em espectrofotômetro. As amostras foram diluídas a 1:2 em tampão da amostra (item 3.10.10) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida, seguindo-se o mesmo procedimento acima citado.

### 3.5 Immunoblotting

A especificidade dos anticorpos monoclonais dirigidas aos antígenos da membrana externa da cepa N753/00, foi analisada pela técnica de *immunoblot* conforme descrito por WEDEGE e FRØHOLM (1986) com algumas modificações. Inicialmente, 150µg de proteínas de VMEs da cepa foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, em presença de dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE, segundo LAEMMLI e então, transferidas para membrana de nitrocelulose (poro de 0,45µm Bio-Rad®) a uma corrente constante de 100mA por 30 minutos, empregando-se o sistema de transferência eletroforética Trans-Blot Semy Dry (Bio-Rad Laboratories®) e tampão contendo Tris-Base 0,025 M e glicina 0,16 M, pH 8,5. Após a transferência das proteínas, a membrana foi cortada em 25 fitas correspondendo cada uma a aproximadamente 6µg de proteína antes da transferência. Para verificação da eficiência da transferência uma das fitas foi corada com negro de amido (item 3.10.9) e descorada com solução de metanol / ácido acético (item 3.10.13). Da adição dos anticorpos monoclonais até a revelação da reação seguiu-se o procedimento da técnica de *dot blotting* (item 3.2.3).

### 3.6 Eluição de proteína de classe 1 (PorA)

Um volume de 2 mL contendo 3,5 mg de VME da cepa N.753/00 foi precipitada com 8,0 mL de etanol gelado a -20°C por 16 horas. Após centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL com tampão de amostra contendo uréia (item 3.10.10) e submetido à fervura por 10 minutos. A amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida a 10% contendo 8M de uréia (item 3.10.11) e com dimensões de 7cm de altura, 8 cm de comprimento e 1,5 mm de espessura. O gel foi submetido a uma corrida

eletroforética por 90 minutos a 30 mA empregando-se o Sistema Mini-Protein II (Bio-Rad). Após a eletroforese, as extremidades do gel foram cortadas verticalmente e coradas com azul brilhante de Coomassie (item 3.10.12) servindo, assim, como guias para a localização da banda correspondente à proteína de classe 1, que foi cortada com o auxílio de bisturi. A tira de gel contendo a banda correspondente à PorA foi recortada em pequenos pedaços que foram colocados em um saco de diálise (SIGMA® n. 250-70) para eluição da proteína do gel. O saco de diálise contendo a proteína em pequenos pedaços e tampão eletroeluidor (item 3.10.14) foi submetido a uma eletroeluição a 100mA por quatro horas, com uma troca de tampão após 2 horas. A eletroeluição foi realizada em cuba horizontal (Gibco BRL Life Technologies®) utilizando-se a fonte EPS 200 (Pharmacia Biotech®). Após a eletroeluição, procedeu-se a diálise com tampão 1mM Tris-HCl pH 6,8 por 48 horas a 4°C sob agitação. Durante este período foram feitas três trocas, empregando-se três litros de 1mM Tris-HCl pH 6,8 a cada vez. Após a diálise, a amostra foi liofilizada e reconstituída com 200 uL de água destilada estéril e, a concentração da proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al., 1951.

### **3.7 Clivagem da proteína de classe 1 (PorA) pelo brometo de cianogênio (CNBr)**

A propriedade do reagente CNBr em clivar a ligação da metionina (GROSS, E. & WITKOP, B., 1962) foi determinante para a escolha deste método químico para clivagem da proteína PorA da N.753/00. O procedimento foi feito em capela química. Em um tubo de ensaio de 16 x 160 mm, com tampa de rosca, foram adicionadas 200 µg de proteína e 1 mL de ácido fórmico a 70% em água e mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Com o objetivo de se processar a

clivagem da proteína pelo CNBr na ausência de oxigênio, condição esta que favorece a clivagem pelo CNBr, adicionou-se nitrogênio gasoso à solução proteína/ácido fórmico e imediatamente a seguir, foram adicionados 60 mg de CNBr (SIGMA®). O tubo foi embrulhado em papel alumínio (para reação em ambiente escuro) e mantido a 37°C por cerca de 24 horas. No dia seguinte, a solução foi diluída com 10 volumes de H<sub>2</sub>O e dialisada por 48 horas com Tris-HCl 1 mM, pH 6,8 sob agitação a 4°C. Foram realizadas, durante este período três trocas de tampão, utilizando-se a cada vez, três litros de tampão Tris-HCl 1mM pH 6,8. Após a diálise, o produto foi submetido à liofilização (Super Modulyo Freeze Dryer – Edwards®). O liofilizado foi ressuspenso em 100 µL de água destilada. Um volume de 5 µL foi homogeneizado em 5 µL de tampão de amostra (item 3.10.10) e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, 200 Volts por 35 minutos para verificação da eficácia da clivagem da PorA pelo CNBr e, também, para posterior procedimento de *immunoblotting*.

### **3.8 Produção dos anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para as proteínas da cepa N753/00**

#### **3.8.1 Imunização dos camundongos**

Quatro camundongos BALB/c, de seis semanas de idade, foram imunizados por quatro semanas consecutivas por via subcutânea ou intraperitoneal com suspensão de células íntegras da cepa N.753/00 em PBS contendo formalina a 0,05% e ajustada a uma transmitância de 75% em 540 nm, conforme o esquema de inoculação descrito no quadro 3. Uma dose reforço (100 µL) foi administrada por via intraperitoneal cinco dias antes da esplenectomia.

**QUADRO 3. ESQUEMA DE INOCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS**

Semana	Dia	dose ( $\mu$ l)	via
1	0	50	S.C <sup>a</sup>
	2	50	S.C
	4	100	I.P <sup>b</sup>
2	7	100	I.P
	9	200	I.P
	11	200	I.P
3	14	300	I.P
	16	300	I.P
	18	400	I.P
4	21	400	I.P
	23	500	I.P
	25	500	I.P
5 e 6	Descanso		
7	39	100	I.P
7 Fusão	44		

<sup>a</sup>sub-cutânea, <sup>b</sup>intraperitoneal

### 3.8.2 Fusão Celular

As células esplênicas foram obtidas pela raspagem do baço, com auxílio de agulhas e pinça, em uma placa de Petri contendo 15 mL de tampão lise de hemácias (item 3.10.15) O homogeneizado celular foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e mantido em repouso por 2 minutos para sedimentação das partículas maiores. Em seguida, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para outro tubo de fundo cônico. O tubo foi centrifugado a temperatura ambiente a 150 x g durante 7 minutos. As células foram lavadas uma vez com meio RPMI 1640 (Gibco®) a 150 x g por 7 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de RPMI sem soro. Procedeu-se a contagem dos linfócitos em câmara de Neubauer empregando-se o corante azul de tripan 0,25% em PBS.

Para a fusão foram usadas células de mieloma SP3X63-Ag8.UI (P3UI) em fase logarítmica, crescidas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (Interlab®). As células foram coletadas e transferidas para tubos cônicos de 50 mL e lavadas 3 vezes com o meio de RPMI sem soro por 7 minutos a 150 x g. Procedeu-se a contagem das células em câmara de Neubauer empregando-se o corante azul de tripan 0,25% em PBS.

Em seguida, as células esplênicas e de mieloma foram misturadas de modo a se obter proporções iguais de células das duas linhagens ou seja,  $2 \times 10^8$  células de cada uma delas. O volume foi completado para 50 mL com meio RPMI e centrifugado por 7 minutos a 400 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi desprendido do fundo do tubo para as paredes do tubo com suave agitação. Vagarosamente, com suave agitação, foi adicionado 1 mL de solução de polietilenoglicol (PEG-4000) 50% em RPMI sem soro, pré-aquecido a 37°C durante 45 segundos. O tubo foi centrifugado a 150 x g por 30 segundos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de RPMI sem soro por 1 minuto, após o que, foram adicionados 20 mL de RPMI sem soro por 2 minutos. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 150 x g por 30 segundos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso vagarosamente com 10 mL meio pós-fusão (MPF item 3.10.16), em seguida o volume foi completado para 50 mL com MPF. Foram preparadas três diluições :

$\frac{1}{2}$  : 42 mL de suspensão celular + 42 mL de MPF  $\Rightarrow$  distribuída em sete placas de cultura celular (Costar®) de fundo plano com 96 cavidades,

$\frac{1}{4}$  : 7 mL de suspensão celular + 21 mL de MPF  $\Rightarrow$  distribuída em três placas de cultura celular de fundo plano com 96 cavidades,

$\frac{1}{8}$  : 10 mL da diluição ( $\frac{1}{2}$ ) + 30 mL de MPF  $\Rightarrow$  distribuída em quatro placas de cultura celular de fundo plano com 96 cavidades. A distribuição das diluições nas placas

(100  $\mu$ L /cavidade) foi feita de maneira vagarosa para evitar rompimento das células recentemente fundidas. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. No quarto dia de incubação, foram adicionados 100  $\mu$ L de MPF em cada cavidade e as placas foram novamente incubadas nas condições acima citadas. Por volta do oitavo dia, as cavidades contendo células híbridas que apresentaram multiplicação celular tiveram seus sobrenadantes coletados para pesquisa de anticorpos. O monitoramento da multiplicação celular foi feito com auxílio de uma lupa (Carl Zeiss - Jena).

### **3.8.3 Clonagem das células híbridas**

As células híbridas, cujos sobrenadantes apresentaram anticorpos secretores contra proteínas de classes e detectados pela técnica de *immunoblotting*, foram selecionadas e as clonagens foram realizadas por meio da técnica de diluição limitante. Foram realizadas contagens das células híbridas em câmara de Neubauer a partir do que, foram preparadas duas diluições, em meio de clonagem (item 3.10.17), de maneira a se obter 1 célula por 100  $\mu$ L e 0,5 célula por 100  $\mu$ L. As placas de cultura celular com 96 cavidades foram inoculadas com 100  $\mu$ L das diluições limitantes, por cavidade e incubadas por cerca de 10 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após cinco dias de incubação, iniciou-se o monitoramento visual das cavidades que apresentavam inicialmente uma única célula para verificar posteriores formações de colônias. Os sobrenadantes das cavidades onde houve a formação de colônias de clones foram coletados e analisados quanto à secreção de anticorpos específicos pela técnica de *immunoblotting*. Os clones secretores de anticorpos monoclonais ou hibridomas selecionados foram expandidos para placas de 24 cavidades em meio de clonagem



e após seu desenvolvimento e estabilização, foram re-testados por *immunoblotting* para averiguar sua atividade secretora.

### **3.8.4 Manutenção Celular**

Todas as linhagens celulares ou hibridomas, foram mantidas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, em garrafas plásticas para cultura celular (Corning®) estéreis e descartáveis. A manutenção das linhagens celulares foi realizada diariamente, com trocas de meio e transferência para garrafas de maior capacidade, favorecendo a expansão celular. As culturas celulares híbridas foram expandidas, visando a obtenção de sobrenadantes contendo os anticorpos monoclonais, a produção de líquido ascítico e a criopreservação celular.

### **3.8.5 Produção de Líquido Ascítico**

Dez camundongos BALB/c foram inoculados pela via intraperitoneal com 0,5 mL de pristane (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane) para a distensão das alças intestinais. Após sete dias, esses animais foram inoculados com os clones secretores de anticorpos, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, pela mesma via. Os animais foram monitorados quanto à formação de líquido ascítico, o que ocorreu em aproximadamente 10 dias. O líquido foi coletado com o auxílio de agulha 40 x 12 mm e centrifugado a 300x g por 30 minutos. O sobrenadante coletado foi acondicionado a -20°C.

### **3.8.6 Criopreservação das Células**

Para o congelamento das células as culturas foram expandidas de forma a se obter uma contagem celular aproximada de  $1 \times 10^8$ /linhagem. As suspensões celulares foram centrifugadas (150 x g por 7 minutos) para a coleta do sobrenadante e o sedimento foi lavado por centrifugação com meio RPMI sem soro. Após a lavagem, o sedimento foi solubilizado com solução gelada de SFB adicionado de 10% de sulfóxido de dimetila (DMSO, SIGMA®), ajustando-se o volume para uma concentração de  $1 \times 10^7$  células /mL. A suspensão celular foi rapidamente distribuída em volume de 500 uL por tubos de criopreservação (Corning®), em banho de gelo, identificados e colocados a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para  $-70^\circ\text{C}$  por 16 horas, quando finalmente foram armazenados em bujões de nitrogênio líquido.

### **3.8.7 Isotipagem dos Anticorpos Monoclonais**

A determinação das classes e subclasses das imunoglobulinas secretadas pelas linhagens selecionadas foi realizada por meio de ELISA usando-se Mouse hybridoma subtyping kit, Boehringer Mannheim®, seguindo as instruções da firma produtora.

### 3.9 Análise dos genes *porA*, *porB* e 16S RNA ribossomal

#### 3.9.1. Amplificação dos genes *porA* e *porB* e 16S RNA ribossomal

A técnica de reação de polimerase em cadeia (*PCR*) foi utilizada para amplificação dos genes *porA*, *porB* e 16S *rRNA*. Em cada 50  $\mu\text{L}$  de reação foram utilizados :

Tampão da *PCR* com  $\text{MgCl}_2$  10X (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>) na concentração final de 1X; desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) 100mM (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>) na concentração final de 200 $\mu\text{M}$ ; iniciadores P14 e P22 (SACCHI et al., 1998; MAIDEN et al., 1991) para amplificação do gene *porA*, PB-A1 e PB-A2 (URWIN, 2001) para amplificação do gene *porB* e P8F e P1492R (ÉDEN, 1991), ambos na concentração final de 0,4  $\mu\text{M}$ . (Os iniciadores foram sintetizados pelo "Core Facility of Centers for Disease Control (CDC)", Atlanta, GA, EUA, tabelas 1, 2 e 3); enzima Taq DNA polimerase (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>), na concentração final de 2,5 Unidades para cada 50  $\mu\text{L}$  de reação; 1,0  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana de cada amostra e água ultrapura estéril para um volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

As amostras e o controle negativo, preparados com água ultrapura estéril, foram incubados no termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer , Foster City , CA, EUA) e submetidos aos seguintes ciclos para amplificação de *porA* e *porB* :

95°C por quatro minutos

5 ciclos (94°C / 1 min., 60°C / 2 min., 72°C / 20 seg.)

25 ciclos (90°C / 30 seg., 60°C / 20 seg., 72 /20 seg.)

72°C por cinco minutos

Após o término da reação foram mantidos a 4°C.

E os seguintes ciclos foram efetuados para a amplificação do 16S rRNA :

95°C por cinco minutos

35 ciclos (94°C / 15 seg., 50°C / 15 seg. 72°C / 1 min e 30 seg.)

72°C por cinco minutos

Após o término da reação foram mantidos a 4°C.

Um volume de 5,0 µL de cada produto amplificado foi homogeneizado com 5,0 µL de solução de arraste e submetido à eletroforese em gel de agarose (SIGMA<sup>®</sup>) a 1,0 % em TAE 1X durante duas horas a 90 volts. Foi usado como marcador de peso molecular para os fragmentos de DNA, 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL Life Technologies<sup>®</sup>). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Sigma<sup>®</sup>) utilizando-se a fonte EPS 200 (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,4 µg / mL por 30 minutos e examinado sob uma fonte de luz ultravioleta de 254 nm (Pharmacia Biotech<sup>®</sup>). O gel foi fotografado com a máquina Polaroid modelo MP-4 Land (Polaroid Corporation, Cambridge, MA, EUA), filme 667 (Polaroid) e filtro laranja (Kodak, Eastman Chemical, New Haven, EUA).

### **3.9.2 Seqüenciamento dos genes *porA*, *porB* e 16S rRNA**

Para a tipagem da proteína PorA somente duas regiões do gene *porA* foram seqüenciadas, as quais contêm as regiões variáveis 1 e 2, designadas VR1 e VR2 respectivamente, com exceção da cepa N.753/00, escolhida para a produção de anticorpos monoclonais, para a qual o gene *porA* foi inteiramente seqüenciado. Para a tipagem da proteína PorB, o que inclui as regiões variáveis de VR1 a VR4, o gene completo da cepa N.753/00 também foi seqüenciado, ao passo que para o

gene 16S, foi seqüenciado um fragmento de 1470 pares de bases. As purificações dos genes *porA* e 16S *rRNA* foram feitas com o *High Pure PCR product purification Kit* (Boehringer Mannheim®), seguindo as instruções da firma produtora. Na reação de *PCR* para o seqüenciamento dos genes *porA*, para determinação da VR1 e VR2, foram utilizados dois iniciadores (U86 e R773), e 14 iniciadores foram utilizados para o seqüenciamento inteiro do gene *porA* da cepa N.753/00 (SACCHI et al., 1998). Para o seqüenciamento do gene *porB* foram utilizados nove iniciadores (URWIN, 2001) e para o 16S *rRNA* 10 iniciadores (ÉDEN et al., 1991). As seqüências dos iniciadores estão apresentadas nas tabelas 2, 3 e 4. Para esse procedimento foi utilizado o *Taq Dye-deoxy terminator cycle Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA., EUA), seguindo as instruções da firma produtora. A purificação das reações de *PCR* para o seqüenciamento foi feita através das colunas *Centri-Sep* (Princeton Separations, Adelphia, N.J., EUA) e o material purificado foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida 5% e uréia 8M, usando o seqüenciador automático ABI modelo 377 (Applied Biosystems®). O consenso das seqüências alinhadas e editadas foi determinado por meio de um programa de computador Lasergene DNA STAR (DNASTAR Inc.).

### 3.9.3 Números de Acesso ao Genbank

Para classificação das regiões variáveis das proteínas PorA, as seqüências de aminoácidos das VR1 e VR2 foram submetidas ao banco de dados das regiões variáveis de PorA de *Neisseria meningitidis* ([http://neisseria.org/Neisseria meningitidis/typing/pora](http://neisseria.org/Neisseria_meningitidis/typing/pora)) e foram baseadas no esquema de SUKER et al., 1996. O esquema de SACCHI et al., 1998 foi seguido para classificação das regiões variáveis das proteínas PorB. A classificação dos tipos de 16S *rRNA* foi determinada baseando-se nos tipos já descritos e disponíveis no Genbank

(<http://www.nlm.nih.gov>). As seqüências dos genes *porA*, *porB* e 16S *rRNA* obtidas no presente estudo foram depositadas no GenBank (<http://www.nlm.nih.gov>), Anexos.

**TABELA 2** Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene *porA*

Iniciador	Seqüência de nucleotídeo
<i>gene porA</i>	
(F) P14	GGG TGT TTG CCC GAT GTT TTT AGG
(R) P22	TTA GAA TTT GTG GCG CAA ACC GAC
Seqüenciamento do gene <i>porA</i>	
(F) 21	CTG TAC GGC GAA ATC AAA GCC GGC GT
(F) U86	GCC CTCGTA TTG TCC GCA CTG
(F) 910	ATC AGG TAC ACC GCC TGA CGG GCG GC
(F) 738	TCG GAT GTG TAT TAT GCC GGT CTG
(F) 435	GCC ATT GAT CCT TGG GAC AGC AA
(F) 773	ATG GCG GTT TTG CCG GGA ACT ATG CC
(R) 435	TTG CTG TCC CAA GGA TCA ATG GC
(R) 773	GGC ATA GTT CCC GGC AAA ACC GCC AT
(R) 910	GCC GCC CGT CAG GCG GTG TAC CTG AT
(R) 738	CAG ACC GGC ATA ATA CAC ATC CGA
(R) 481	TCG TCG TGG CGT TTG AAA ATA CCC A
(R) 272	AAG CTG CCA AAC AGC CTT CAG CCC

(F) e (R), orientações “*forward*” e “*reverse*” dos iniciadores, em relação à direção da transcrição do gene.

**TABELA 3** Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene *porB*

Iniciador	Seqüência de nucleotídeo
<i>gene porB</i>	
(F) PB-A1	TAA ATG CAA AGC TAA GCG GCT TG
(R) PB-A2	TTT GTT GAT ACC AAT CTT TTC AG
Seqüenciamento do gene <i>porB</i>	
(F) PB-S1	GCA GCC CTT CCT GTT GCA GC
(F) 8U	TCC GTA CGC TAC GAT TCT CC
(F) 244U	CGC CCC GCG TTT CTT ACG
(R) PB-S2	TTG CAG ATT AGA ATT TGT G
(R) 8L	GGA GAA TCG TAG CGT ACG GA T
(R) 244L	CGT AAG AAA CGC GGG GCG
(R) PB260	AGT GCG TTT GGA GAA GTC GT

(F) e (R), orientações "*forward*" e "*reverse*" dos iniciadores, em relação à direção da transcrição do gene.



**TABELA 4** Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene 16S RNA ribossomal

Iniciador	Seqüência de nucleotídeo
gene 16S <i>r</i> RNA	
(F) 8	AGT TGA TCC TGG CTC AG
(R) 1492	ACC TTG TTA CGA CTT
Seqüenciamento do gene 16S <i>r</i> RNA	
(F) 357	TAC GGG AGG CAG CAG
(R) 357	CTG CTG CCT CCC GTA
(F) 530	CAG CAG CCG CGG TAA TAC
(R) 530	GTA TTA CCG CGG CTG CTG
(F) 790	ATT AGA TAC CCT GGT AG
(R) 790	CTA CCA GGG TAG CTA AT
(F) 981	CCC GCA ACG AGC GCA ACC C
(R) 981	GGG TTG CGC TCG TTG CGG G

(F) e (R), orientações "*forward*" e "*reverse*" dos iniciadores, em relação à direção da transcrição do gene.

### **3. 10 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES**

Exceto quando especificado, os reagentes utilizados foram das marcas Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EUA) ou Merck (Merck S.A., Rio de Janeiro , R.J, Brasil).

A água ultrapura utilizada nos procedimentos foi obtida pelo Sistema Milli Q de purificação de água (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA).

#### **3.10.1 Ágar chocolate**

O ágar Mueller - Hinton (DIFCO®) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante e esterilizado por autoclavação a 121°C durante 15 minutos. Mantendo-se o meio de cultura a temperatura aproximada de 50°C, adicionou-se sangue desfibrinado de cavalo, na concentração final de 5%. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em tubos estéreis. Controlada a esterilidade, o meio de cultura foi conservado a 4°C até o momento do uso.

#### **3.10.2 Ágar soro**

O *Tryptic Soy Agar* (TSA) (DIFCO®) foi preparado seguindo-se as especificações do fabricante e esterilizado por autoclavação a 121°C durante 15 minutos. Mantendo-se o meio de cultura a temperatura aproximada de 50°C, adicionou-se o soro de cavalo na concentração final de 1%. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em placas estéreis. Controlada a esterilidade, o meio de cultura foi conservado a 4°C até o momento do uso.

### 3.10.3 PBS/Azida

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,345 g
NaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,406 g
NaCl	8,52 g
Azida Sódica (INLAB código. 2260)	0,2 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

### 3.10.4 Solução de Bloqueio

Albumina bovina (SIGMA® A-3350)	3,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	100,0 mL

A solução foi mantida a 4°C.

### 3.10.5 PBS

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,345 g
NaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,406 g
NaCl	8,52 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

### 3.10.6 Tampão Acetato de Sódio

CH <sub>3</sub> COONA	4,1 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

Acertar o pH para 5,0 com ácido acético

A solução foi mantida a 4°C.

### 3.10.7 Solução de AEC

AEC (3-amino-9ethylcarbazole) SIGMA® A5754	0,25 g
N,N-dimetilformamida	25,0 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

### 3.10.8 Solução Reveladora (preparar na hora do uso)

Solução de AEC (item 12.7)	4,0 mL
Tampão acetato de sódio	100,0 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 µL

### 3.10.9 Solução de Negro de amido

Metanol	10,0 mL
Ácido acético	2,0 mL
Negro de amido	0.1 g
Água destilada estéril q.s.p.	100,0 mL

### 3.10.10 Tampão de Amostra com uréia

Tris pH 6.8 0.5 M	2,0 mL
SDS 10%	1,0 g
2-mercapetanol (0.1%)	10 µL
Uréia 8 M q.s.p.	10,0 mL

**3.10.11 Gel de poliacrilamida 10% com 8M de uréia**

Água destilada estéril	1,245 uL
Tampão Tris pH 8.8	2,5 mL
Acrilamida/BIS (40%)	2,5 mL
SDS 10%	100 uL
Uréia 8 M	3,6 mL
TEMED	10 uL
Persulfato de Sódio 10%	10 uL

**3.10.12 Corante de Azul Brilhante de Coomassie**

Coomassie blue	0,5 g
Metanol	180,0 mL
Ácido acético	20 mL

**3.10.13 Solução Descorante**

Metanol	100,0 mL
Ácido Acético	70,0 mL
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

**3.10.14 Tampão Eletroeluidor pH 8.9**

Tris Base	5,055 g
Glicina	3,753 g
SDS	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

### 3.10.15 Tampão de Lise de Hemácias

Tris-Base	1,03 g
NH <sub>4</sub> Cl	3,74 g
Água destilada estéril q.s.p.	500,0 mL

### 3.10.16 Meio Pós-Fusão

RPMI simples	151,0 mL
Sobrenadante de cultivo da linhagem de mieloma	151,0 mL
Soro fetal bovino	90,0 mL
Glutamina 3%	19,0 mL
Sobrenadante de cultivo de baço	23,0 mL
HAT *(50x)	9,0 mL
Gentamicina 50 mg/mL	0,45 µl
OPI** (100x)	7,0 mL

\*Hipoxantina, Aminopterin e Timidina (SIGMA® H-0262)

\*\*oxaloacetato + piruvato + insulina bovina (SIGMA® O-5003)

### 3.10.17 Meio de Clonagem

RPMI simples (GIBCO®)	72 mL
Soro fetal bovino	20,0 mL
Sobrenadante de cultivo de baço	5 mL
HT* (50x)	2,0 mL
Gentamicina 50 mg/mL	100 µl
OPI** (100x)	1,0 mL

\*Hipoxantina e Timidina (SIGMA® H-0137)

\*\*oxaloacetato + piruvato + insulina bovina (SIGMA® O-5003)

### 3.10.18 Solução de Arraste

Ficoll 400	20%
Azul de bromofenol	0,07%
SDS	7,0%
Água destilada estéril q.s.p	100,0 mL

Após dissolução do Ficoll 400 e SDS em água destilada, adicionou-se azul de bromofenol e a solução foi armazenada a temperatura ambiente. A solução de uso foi preparada misturando-se 1,8 mL desta solução com 360  $\mu$ L da solução TBE (item 3.10.20).

### 3.10.19 Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio	0,05 g
Água destilada esterilizada	10,0 mL

O brometo de etídio foi diluído em água destilada e a solução foi armazenada em frasco escuro a temperatura ambiente. No momento de uso, três gotas desta solução foram diluídas em dois litros de água destilada.

### 3.10.20 TBE 10X

Tris Base	108,0 g
Ácido Bórico	55,0 g
EDTA	8,3 g
Água ultrapura estéril q.s.p.	1000 mL

### 3.10.21 Gel de acrilamida 5% e uréia 8M

Uréia	18,0g
Acrilamida-Bis 40% (Bio-Rad®)	5,31 mL
Água ultrapura estéril	25,0 mL
Amberlite IRN-150L (Pharmacia Biotech®)	1,0 g

A solução foi aquecida em banho-maria até a dissolução da uréia e esterilizada por filtração em membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation).

Em uma proveta graduada de 50 mL, foi adicionada a solução de acrilamida filtrada e 5 mL de TBE 10X e o volume foi completado para 50 mL com água ultrapura estéril. Foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de persulfato de sódio (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) a 0,1% e 30  $\mu\text{L}$  de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine).

O material obtido foi misturado delicadamente e aplicado entre as placas de vidro do seqüenciador e deixado a temperatura ambiente durante no mínimo duas horas para polimerização.

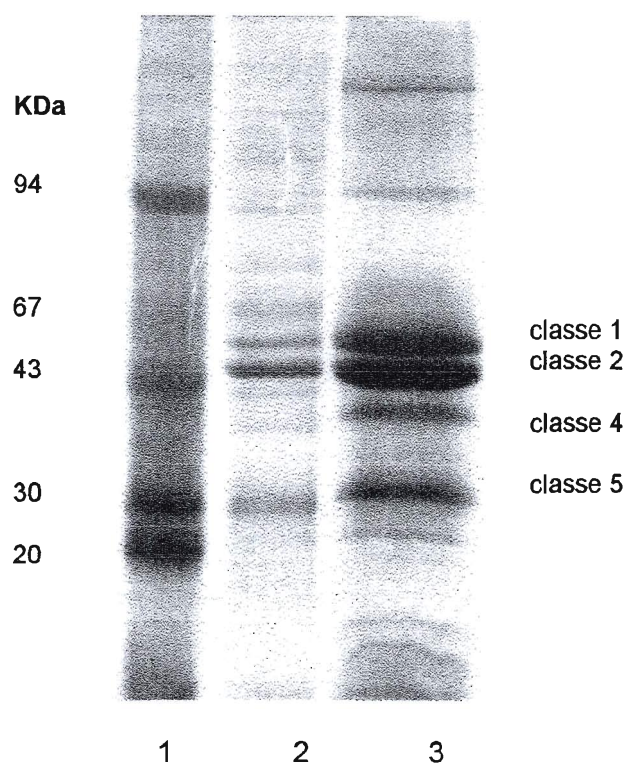


## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das VMEs da cepa N.753/00, representativa do novo fenótipo C:NST:NSST circulante na Grande São Paulo.

A eletroforese da VMEs da cepa N.753/00, em gel de poliacrilamida a 12% em presença de dodecil sulfato de sódio, revelou a presença de bandas na faixa de 25 KDa a 45 KDa, as quais se referem às proteínas de classes de 1 a 5, conforme demonstrado na Figura 4.

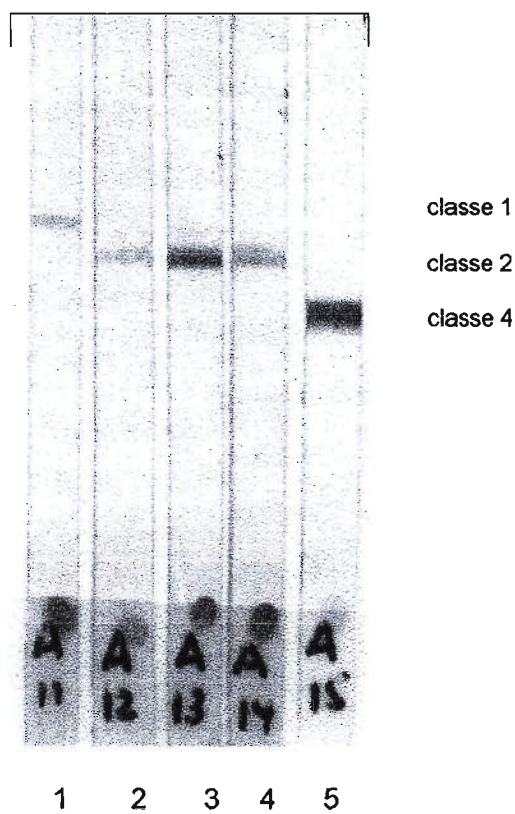


**FIGURA 4.** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12%. Linha 1, padrão de peso molecular (SIGMA® SDS-70L); Linha 2, suspensão de células íntegras da cepa N.753/00; Linha 3, VMEs da cepa N.753/00.

## 4.2 Caracterização dos Anticorpos Monoclonais

Na fusão celular realizada entre células esplênicas dos camundongos BALB/c imunizados e as células de mieloma P3UI, as células fundidas foram distribuídas em 1.344 cavidades de placas de cultura celular, destas, 613 apresentaram desenvolvimento de híbridos. Sobrenadantes destas culturas híbridas foram analisados quanto à secreção de anticorpos por meio da reação de *immunoblotting*. Das 613 cavidades testadas apenas duas linhagens celulares híbridas foram selecionadas, F29-8H11/1E11 e F29-1G1/1B4. A linhagem F29-8H11/1E11 secreta MAb que reconhece a proteína de classe 1, PorA, e a linhagem F29-1G1/1B4 secreta MAb que reconhece a proteína de classe 2, PorB. As classes e subclasses de imunoglobulinas destas linhagens híbridas foram caracterizadas como IgG1.

A especificidade dos anticorpos às proteínas da membrana externa da cepa N.753/00 está demonstrada no *immunoblot* contendo 0,25% de Empigen BB para restaurar o sítio de ligação do anticorpo, Figura 5.



**FIGURA 5.** Especificidade dos MAb secretados pelas linhagens celulares híbridas dirigidas aos antígenos da VME da cepa N.753/00. Fita 1, MAb da linhagem F29-8H11/1E11; Fitas 2 a 4, MAb da linhagem F29-1G1/1B4; Fita 5, guia para proteína de classe 4 (MAb Clone AE3/BE12, Fonte: Laboratório de Híbridomas – FIOCRUZ).

#### 4.2.1 Linhagem celular F29-8H11/1E11

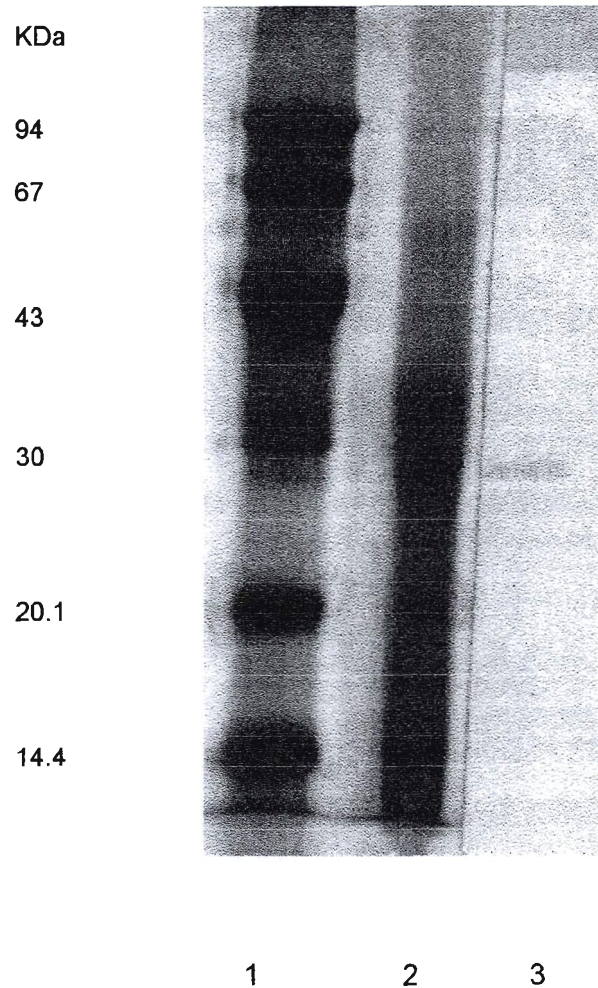
O novo MAb F29-8H11/1E11, que reconhece um epítipo na proteína de classe 1 da cepa protótipo, N.753/00, não apresentou reatividade com nenhuma cepa padrão, o que nos levou a caracterizar as regiões variáveis da proteína PorA da cepa N.753/00.

Foi demonstrado que a seqüência do gene *porA* (GenBank AY737715, Anexo 1) da cepa N.753/00 codifica a VR1 tipo 22 e VR2 tipo 14-6 (VR1-22 e VR2-14-6).

#### 4.2.2. Determinação do epítipo reconhecido pelo MAb F29-8H11/1E11

Para determinar o epítipo reconhecido pelo MAb, a proteína PorA foi submetida à clivagem pelo CNBr, gerando dois fragmentos que quando submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% resultou em duas bandas de aproximadamente 16kDa e 25kDa. Os fragmentos foram submetidos à reação de immunoblotting com o novo MAb que reagiu com o fragmento de 25kDa, que sabidamente é o fragmento que contém a VR2 que é o tipo P1.14-6. O novo MAb é referido a partir de então como P1.14-6, Figura 6.

Foram selecionadas randomicamente para o seqüenciamento do gene *porA* 40 cepas (20%) das 196 cepas que reagiram com o MAb da linhagem F29-8H11/1E11 para confirmar a presença do epítipo VR2-P1.14-6. Todas as cepas selecionadas apresentaram as seqüências VR-1 do tipo 22 e VR2 do tipo P1.14-6, confirmando a presença do epítipo.



**FIGURA 6.** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12% da proteína PorA da cepa N.753/00 clivada pelo brometo de cianogênio (CNBr) e sua reatividade com o MAb secretado pela linhagem F29-8H11/1E11. Linha 1, padrão de peso molecular (SIGMA SDS-70L®); Linha 2, proteína PorA clivada pelo CNBr; Linha 3, reatividade do MAb com o fragmento de 25KDa.

### 4.2.3 Linhagem celular F29-1G1/1B4

A seqüência do gene *porB* (GenBank AY972814, Anexo 2) da cepa N.753/00 codifica a proteína PorB que apresenta VR1-D, VR2-Ed, VR3-D e VR4-Db. Comparando-se os resultados das seqüências de aminoácidos de proteínas PorB já conhecidas e considerando-se que o MAb F29-1G1/1B4 não reagiu com as cepas M136 (VR-1-D, VR2-16, VR3-11,VR-4-D), 503/93 (VR1-C, VR2-Ed, VR3-5a, VR4-Db), N.257/93 (VR1-Cb, VR2-Ed, VR3-C, VR4-Ca) e 35E (VR1-C, VR2-2c, VR3-2bb, VR4-Db), mas reagiu com a cepa N.753/00, a região variável reconhecida pelo MAb, por exclusão, só poderia ser a VR3. O novo MAb que reconhece a VR3 do tipo D foi então definido, a partir deste ponto, como MAb 23, dado que o sorotipo 22 foi o último a ser inserido no painel internacional de MAbs e região variável 3 do tipo D foi definida, também, a partir de então, como VR3-23, Tabela 6.

### 4.2.4. Confirmação da presença da VR3-23

Foram selecionadas randomicamente para o seqüenciamento do gene *porB*, 50 cepas (20%) das 246 cepas que reagiram com o MAb 23, para confirmação da presença da VR3-23. Todas as cepas selecionadas apresentaram as seqüências VR1-D; VR2-Ed, VR3-23 e VR4-Db, confirmando a presença do epítipo. As seqüências foram publicadas no GenBank , e seus respectivos números de acesso encontram-se no Anexo 3.

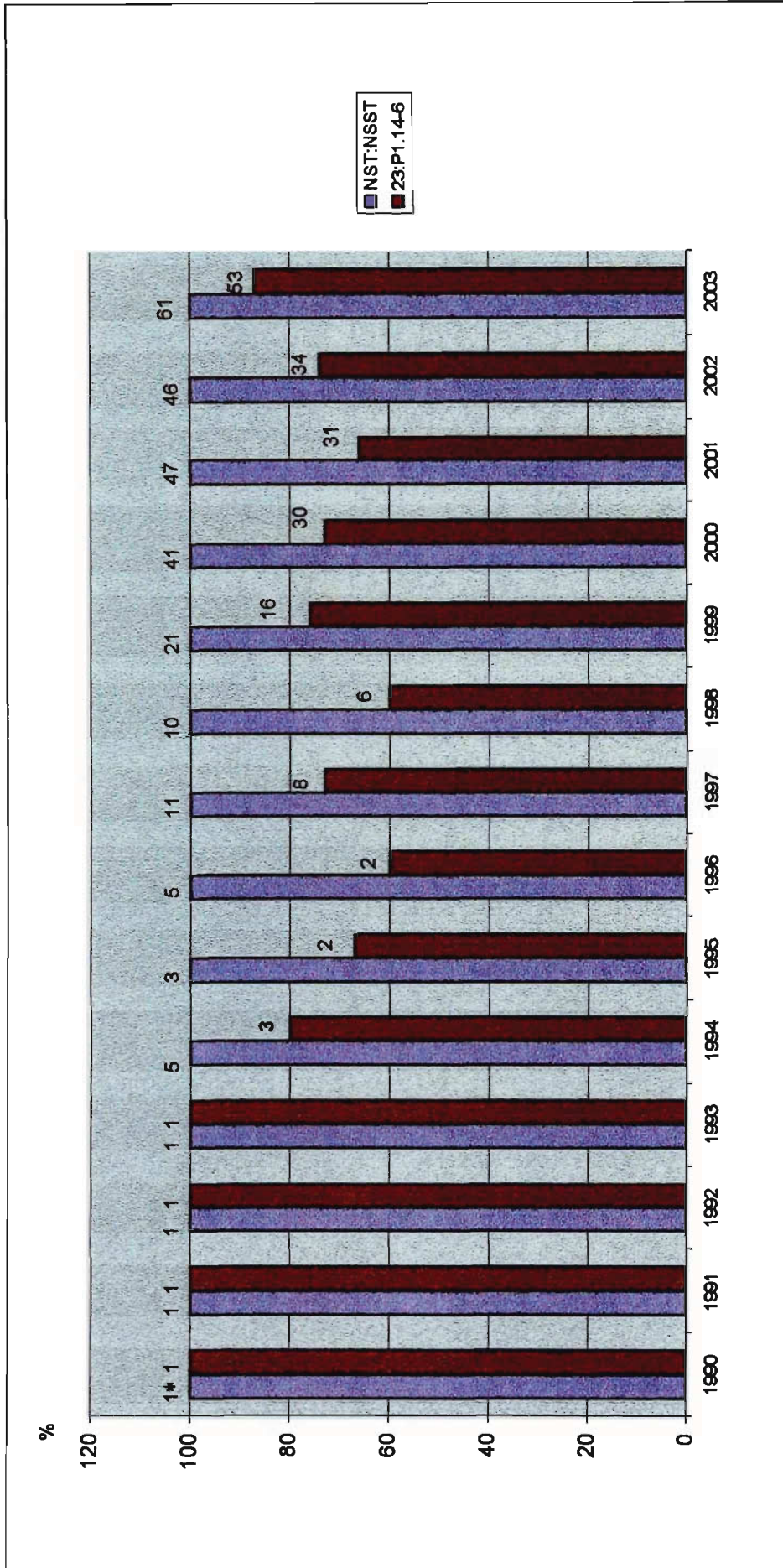
TABELA 6 CARACTERÍSTICAS DOS TIPOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DA PROTEÍNA PORB DE *Neisseria meningitidis* E A REATIVIDADE COM O MAB DA LINHAGEM CELULAR F29-1G1/1B4.

Cepa		Tipo de VR da PorB				Reatividade
		VR1	VR2	VR3	VR4	
N.753/00	AY972814	D	Ed	D	Db	+
M136	U95366	D	16	11	D	-
503/93	U92906	C	Ed	5a	Db	-
N.257/93	U92914	Cb	Ed	C	Ca	-
35E	X67940	C	2c	2bb	Db	-



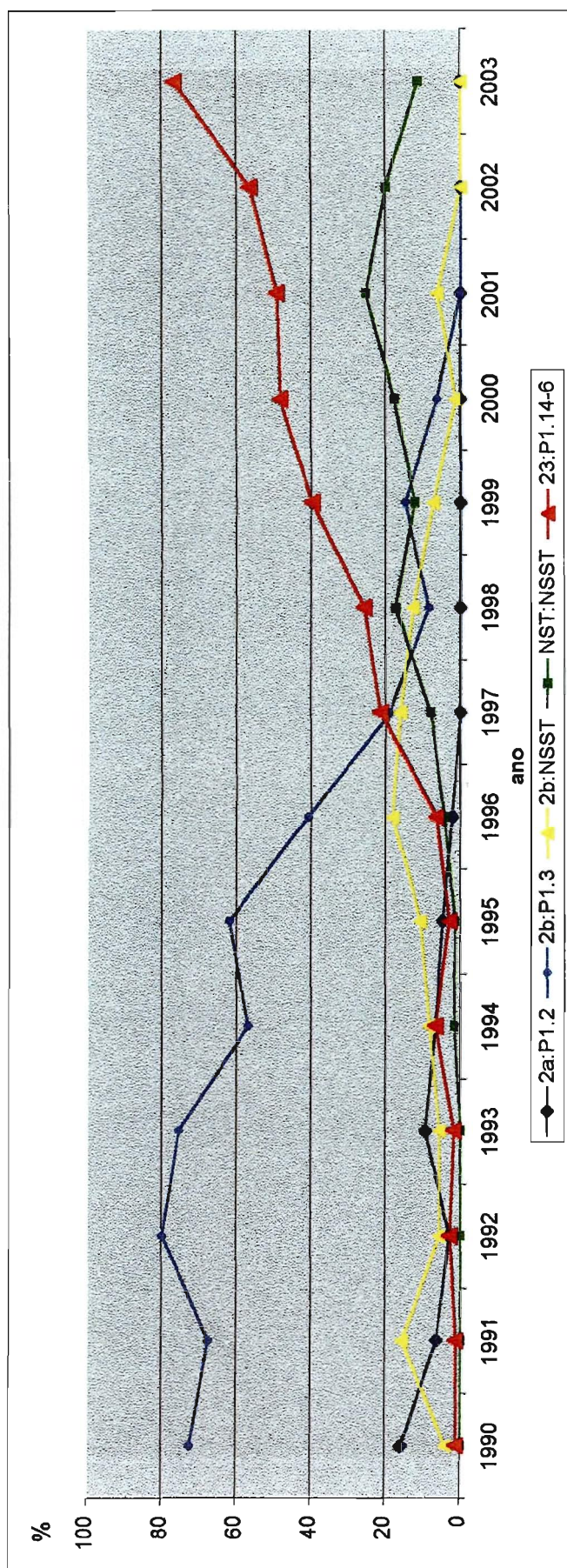
### **4.3 Caracterização das cepas de *Neisseria meningitidis* C por meio da técnica de Dot Blotting com os MAb 23 e P1.14-6**

Todas as 753 cepas foram submetidas à técnica de *dot blotting* com os novos MAb 23 e P1.14-6. Os novos MAb não reagiram com quaisquer cepas que previamente haviam sido sorotipadas completamente, indicando assim, ausência de reatividade cruzada. O MAb 23 reagiu com quatro das 20 cepas NST:sorosubtipável (NST:P1.2; NST:P1.3; NST:P1.5; NST:P1.9) e o MAb P1.14-6 reagiu com uma das 83 cepas sorotipável:NSST (4,7:NSST). Entre as 255 cepas inicialmente caracterizadas como NST:NSST, 75% ( $n=191$ ) delas se tomaram completamente sorotipadas como 23:P1.14-6. No gráfico 2 pode ser observado o aumento do número de cepas soro-sorosubtipadas apresentando o fenótipo C:23:P1.14-6, a partir da produção destes novos MAb. Entre as 64 cepas NST:NSST restantes, cinco passaram a ser sorosubtipável, mas continuaram não sorotipáveis (NST:P1.14-6), 55 passaram a ser sorotipável, mas permaneceram não sorosubtipável (23:NSST) e quatro continuaram NST:NSST. A distribuição dos fenótipos prevalentes de cepas de *Neisseria meningitidis* C isoladas na Grande São Paulo de 1990 a 2003 após a introdução dos MAb para o sorotipo 23 e sorosubtipo P1.14-6 está apresentado no gráfico 3.



**GRÁFICO 2.** Percentual de cepas C:23:P1.14-6 em relação às cepas previamente caracterizadas como C:NST:NSST isoladas na Grande São Paulo de 1990 a 2003.

\*Os números acima de cada coluna representam o número de cepas.

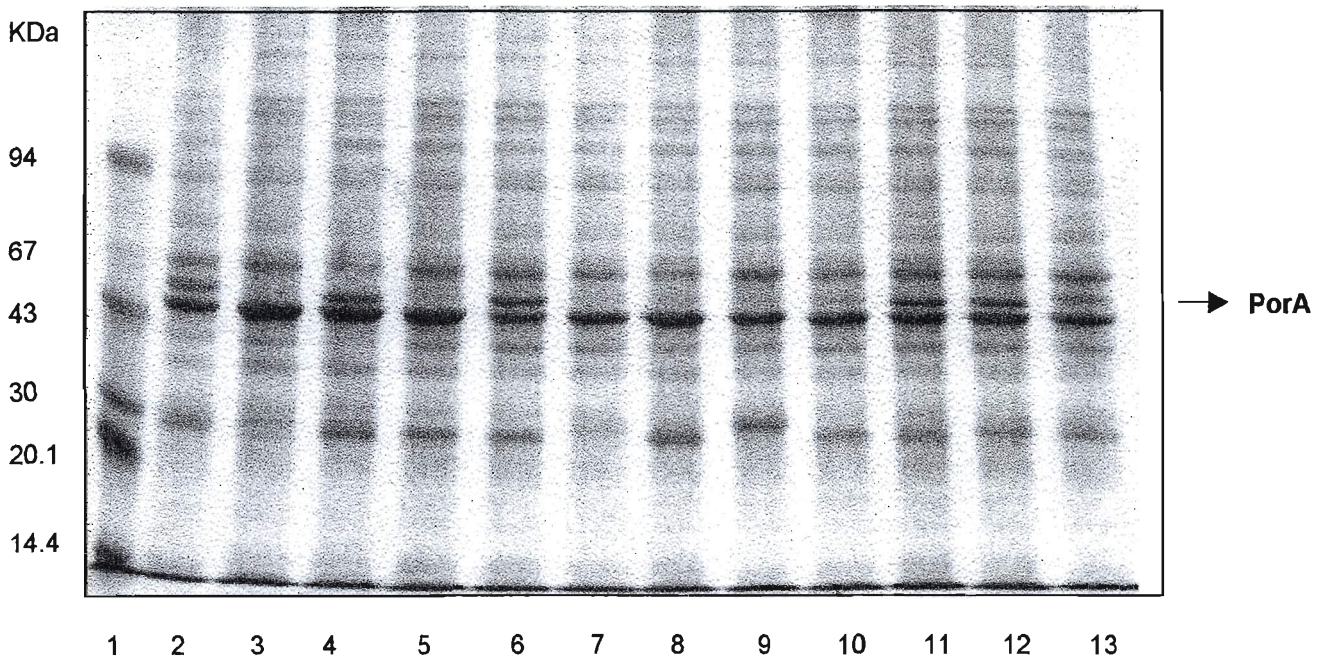


**GRÁFICO 3.** Distribuição dos fenótipos prevalentes de cepas de *Neisseria meningitidis* C isoladas na Grande São Paulo de 1990 a 2003 após a introdução dos MAb's para o sorotipo 23 e sorosubtipo P1.14-6.

#### 4.4 Expressão das proteínas PorA em SDS-PAGE e Tipagem das Regiões Variáveis da proteína PorA

Mesmo após a introdução dos dois novos MAbs produzidos, 23 e P1.14-6, 59 cepas ainda permaneceram como NSST (C:23:NSST  $n=55$  e C:NST:NSST  $n=4$ ). Quando analisadas em gel de poliacrilamida a 12%, 14, 20 e 25 destas cepas mostraram alta, baixa ou não expressão de proteína de classe 1, respectivamente, como exemplificado na figura 7. Estas diferenças no nível de expressão da proteína, assim como a presença de diferentes epítomos nas regiões variáveis da proteína PorA poderiam ser as razões para a ausência de reatividade do MAb P1.14-6 com essas 59 cepas. Para verificar estas hipóteses, as 59 cepas foram submetidas à tipagem das VRs da PorA por seqüenciamento. Os resultados mostraram a existência de três diferentes tipos de PorA entre as 14 cepas com alta expressão de proteína de classe 1, ou sejam, P1.22,14-6 ( $n=1$ ), P1.7-2,13-1 ( $n=10$ ), P1.18-7,9 ( $n=3$ ); quatro diferentes tipos de PorA entre as 20 cepas com baixa expressão de proteína de classe 1: P1.22,14-6 ( $n=17$ ), P1.19,15 ( $n=1$ ), P1.7-2,13-1 ( $n=1$ ), P1.18-7,9 ( $n=1$ ) e dois diferentes tipos de PorA entre as 25 cepas sem expressão de proteína de classe 1: P1.22,14-6 ( $n=21$ ) e P1.7-2,13-1 ( $n=4$ ). Portanto, 39 das 59 cepas NSST carregavam informação genética para o epítomo P1.14-6 e as 20 cepas restantes carregavam informação genética para epítomos de outros soro-subtipos.





**FIGURA 7.** Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida a 12%, de cepas NSST apresentando diferentes níveis de expressão da proteína de classe 1 (PorA). Linha 1, padrão de peso molecular (SIGMA SDS-70L); Linhas 2, 4, 6, 11, 12 e 13, cepas com alto nível de expressão de PorA; Linha 10, cepa com baixo nível de expressão de PorA; Linha 3, 5, 7, 8 e 9, cepas com ausência de PorA.

#### **4.5 Estudo da diversidade genética das cepas de *Neisseria meningitidis* C pela tipagem do gene 16S rRNA**

A análise da diversidade das seqüências do gene 16S rRNA das cepas de *N. meningitidis* foi feita com a finalidade de verificar a relação genética entre diversos fenótipos de *N. meningitidis* C. As 62 cepas analisadas pela tipagem do gene 16S rRNA foram selecionadas randomicamente contemplando 10% de cada um dos quatro fenótipos prevalentes: C:NST:NSST ( $n=25$ ), C:2b:P1.3 ( $n=27$ ), C:2a:P1.2 ( $n=4$ ) e C:2b:NSST ( $n=6$ ), Tabela 7.

O seqüenciamento adicional das regiões variáveis da PorA entre estas 62 cepas, representando os quatro fenótipos prevalentes no período, demonstrou a presença de apenas três combinações de VRs: P1.18,3; P1.5,2 e P1.22,14-6, Tabela 7.

As seqüências de fragmento com 1470 pares de bases do gene 16S rRNA de cada uma destas 62 cepas foram alinhadas e comparadas entre si e, submetidas ao GenBank. Nas posições 64, 179, 182, 222, 441, 449, 717 e 1415 foram encontradas diferenças de nucleotídeos. Em sete dessas posições, as diferenças encontradas, ocorreram por transição, isto é, ou alternaram na posição as bases citosina ou timina (75%) ou modificaram na posição das bases adenina ou guanina (12,5%). Na posição 222 foi encontrada, em todas as cepas analisadas, somente adenina ou no máximo um R, este último significa a presença de base A ou G alternadamente, Tabela 8.

A composição de nucleotídeos destas oito posições determinou cinco tipos diferentes de 16S entre as 62 cepas analisadas, Tabela 7, compatíveis com os tipos 13, 17, 91, 125 e 145 de rRNA descritos por SACCHI et al., 2002 e cujas seqüências encontram-se disponíveis no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.org](http://www.ncbi.nlm.nih.org)).

O dendrograma filogenético construído a partir dos cinco tipos de 16S encontrados entre as 62 cepas de *Neisseria meningitidis* estudadas, confirma a estreita relação genética existente entre os tipos 13 e 145. O tipo 125 apresentou-se distante filogeneticamente do tipo 91; e, por fim, o 16s do tipo 17, representado exclusivamente por cepas de fenótipo C:23:P1.14-6, apresentou-se distante filogeneticamente dos outros tipos de 16S encontrados.

TABELA 7 CARACTERIZAÇÃO DE 62 CEPAS DE *Neisseria meningitidis* QUANTO AO SOROGRUPO, SOROTIPO, SOROSUBTIPO, TIPO DE PorA e TIPO DE 16S ASSOCIADOS AO NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK

Cepa	Grupo	Sorotipo	Soro-subtipo	PorA		Tipo de 16S	N. de acesso ao Genbank
				VR1 <sup>c</sup>	VR2 <sup>d</sup>		
N297/99	C	NST <sup>a</sup>	NSST <sup>b</sup>	22,14-6		17	AY238896
N.753/00	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF398322
N490/96	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY238898
N268/97	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY238899
N565/98	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY238900
N1/94	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY238901
N840/93	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY238902
N1048/95	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY238903
N2/01	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF521625
N430/00	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522557
N727/00	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522562
N260/92	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522593
N730/91	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522595
N1097/90	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522596
N849/01	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522604
N.429/94	C	NST	NSST	22,14-6		17	AF522591
N320/02	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735380
N381/02	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735381
N616/02	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735383
N677/03	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735388
N817/03	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735382
N261/03	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735389
N274/03	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735386
N575/03	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735387
N.923/02	C	NST	NSST	22,14-6		17	AY735384
N.419/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY137384
N.1003/90	C	2b	P1.3	18,3		91	AY137382
N.1118/90	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238906
N.619/92	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238907
N.750/90	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238908
N.284/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238909
N.49/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238910
N.74/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238911
N.80/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238912
N.901/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238913
N.276/92	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238914
N.485/93	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238915
N.664/94	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238916
N.669/94	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238917
N.964/94	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238918
N.656/95	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238919
N.222/95	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238920
N.195/91	C	2b	P1.3	18,3		91	AY146971
N.716/95	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238921
N.1437/95	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238922
N.374/96	C	2b	P1.3	18,3		91	AY146973
N.496/96	C	2b	P1.3	18,3		125	AY238934
N.604/96	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238923
N.831/97	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238924
N.393/97	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238925
N.158/98	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238926
N.1019/97	C	2b	P1.3	18,3		91	AY238927

continuação

Cepa	Grupo	Sorotipo	Soro-subtipo	PorA		Tipo de 16S	N. de acesso ao Genbank
				VR1 <sup>c</sup>	VR2 <sup>d</sup>		
N.668/90	C	2a	P1.2	5,2		13	AY137381
N.1180/95	C	2a	P1.2	5,2		145	AY176646
N.913/99	C	2a	P1.2	5,2		13	AY238905
N.536/91	C	2a	P1.2	5,2		13	AY735350
N.1031/91	C	2b	NSST	18,3		91	AY137380
N.113/00	C	2b	NSST	18,3		91	AY150572
N.1080/94	C	2b	NSST	18,3		91	AY146972
N.188/91	C	2b	NSST	18,3		91	AY146974
N.381/92	C	2b	NSST	18,3		91	AY146970
N.1101/95	C	2b	NSST	18,3		91	AY146969

Todas as cepas C:NST:NSST reagiram com os Mabs 23 e P1.14-6, sendo portanto C:23:P1.14-6

<sup>a</sup> não sorotipável

<sup>o</sup> não sorosubtipável

<sup>c</sup> região variável 1

<sup>d</sup> região variável 2



**Tabela 8.** Tipos de 16S entre as 62 cepas de *Neisseria meningitidis* analisadas pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA ribossomal

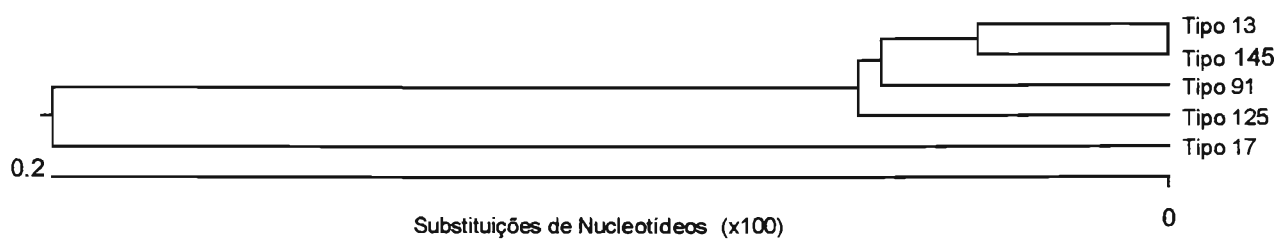
Fenótipo	Tipo de 16S	Posição do nucleotídeo <sup>1</sup> no gene 16S rRNA							
		64	179	182	222	441	449	717	1415
C:NST:NSST*	17	C	C	T	A	C	C	T	G
C:2a:P1.2	13	C	T	C	A	T	T	C	G
	145	T	T	C	A	T	T	C	G
C:2b:P1.3	91	C	T	C	A	C	C	C	A
C:2b:NSST	125	Y**	Y	Y	R***	Y	T	C	A

<sup>1</sup> A=Adenina, C=Citosina, T=Timina e G=Guanina

\*cepas reagentes com MAbs 23 e P1.14-6

\*\* C ou T

\*\*\*A ou G



**FIGURA 8** Dendrograma filogenético construído com os cinco tipos do gene 16S RNA ribossomal de *Neisseria meningitidis*. A escala representa o número de substituições a cada 100 resíduos no gene 16S rRNA.

## **4. RESULTADOS**

O aumento da incidência da DM em uma população é, em grande parte, o reflexo da introdução, transmissão e aquisição de um novo clone virulento, do número de susceptíveis expostos a esse novo clone e de fatores ambientais que aumentam a transmissão ou invasão dessas cepas, como por exemplo, aglomerados populacionais. Em períodos epidêmicos e hiperendêmicos o coeficiente de incidência da DM pode extrapolar 20 casos por 100.000 habitantes (SCHWARTZ et al., 1989; RIEDO et al., 1995; TZENG et al., 2000; MORLEY & POLLARD, 2001).

Ainda não são suficientemente conhecidas as razões que possam explicar o aparecimento de uma epidemia. São múltiplos os fatores descritos na literatura que podem contribuir para que uma epidemia se instale, como aqueles ligados aos agentes etiológicos, ao hospedeiro ou ao meio ambiente.

O risco de uma epidemia por meningococo difere entre os sorogrupos. O comportamento epidêmico mais explosivo está associado ao sorogrupo A, mas os sorogrupos B, C , W135 e Y também podem causar surtos e epidemias. Certas linhagens se apresentam de forma mais virulenta, e portanto são designadas de linhagens hipervirulentas, que foram e são ainda responsáveis por surtos e epidemias ao redor do mundo (TIKHOMIROV et al., 1997).

Fatores individuais do hospedeiro que predisõem à invasão pelo meningococo têm sido bem documentados. Os mais conhecidos são as deficiências do sistema complemento, em particular as deficiências dos componentes C5 a C8. Mais recentemente foram descritos casos de Doença Meningocócica em pessoas com deficiências dos componentes C2, C3, C4b e C9 (RIEDO et al., 1995). Ausência ou disfunção da properdina, um componente da via alternativa de

ativação do sistema complemento, também tem sido associada a um aumento do fator de risco de aquisição da doença. Relatos também têm associado deficiências das imunoglobulinas dos tipos M e G, nesta em particular a subclasse 2 com o maior risco à doença (RIEDO et al., 1995).

Fatores ambientais, tais como a baixa umidade e temperatura são exemplos de condições climáticas que podem favorecer a invasão do meningococo por alterar a barreira mucosa do hospedeiro e inibir as defesas imunes da mesma. Somados às condições climáticas, existem fatores relacionados às condições de higiene do hospedeiro, tais como, as infecções do trato respiratório superior que podem ser consideradas como um importante fator para a ocorrência de epidemias. As infecções respiratórias poderiam aumentar a susceptibilidade à Doença Meningocócica, por um mecanismo não específico, como a ruptura da mucosa da faringe, supressão transitória da resposta imune, ou por meio de manifestações fisiológicas, como a tosse e o espirro, que poderiam potencializar a transmissão do meningococo favorecendo a ocorrência de epidemias.

A baixa condição sócio-econômica promovendo aglomerados populacionais está associada a um aumento da incidência da Doença Meningocócica e, a facilidade de migração das pessoas pelo mundo favorece a disseminação de cepas virulentas nas populações, por vezes susceptíveis (TIKHOMIROV et al., 1997).

Modelos hipotéticos nos fornecem explicações razoáveis para vários aspectos no comportamento complexo de uma epidemia por meningococo, mas o completo entendimento deste comportamento ainda apresenta lacunas a serem preenchidas.

A década de 90 foi marcada por mudanças no cenário epidemiológico mundial da Doença Meningocócica causada pela *N. meningitidis* C. Em diferentes países foram relatados não somente aumentos dos Coeficientes de Incidência da Doença Meningocócica causada pelo sorogrupo C, mas também aumentos da letalidade, associados a esse sorogrupo (BRADBURY, 1999; MOORLEY & POLLARD, 2002; BRICKS, 2003). Estes eventos estiveram sempre associados à emergência e disseminação de novos clones pertencentes às linhagens hipervirulentas do Complexo ET-37 ou do Grupo A4 em uma determinada população (JACKSON et al., 1995; WHALEN et al., 1995; CAUGANT, 1998; MAIDEN e SPRATT, 1999).

Desde o início da década, foram descritos vários surtos por *N. meningitidis* C nos Estados Unidos (JACKSON et al., 1995; ROSENSTEIN et al., 1999). POPOVIC et al., 2001, em estudos de investigação epidemiológica, em diversas áreas do território americano, demonstraram que a mudança epidemiológica observada nos Estados Unidos, com a ocorrência de diversos surtos da Doença Meningocócica, estava associada à linhagem hipervirulenta do Complexo ET-37, representada pelo fenótipo C:2a:P1.5,2.

Durante 1996 e 1997, a Espanha foi invadida por uma onda epidêmica de Doença Meningocócica causada pelo sorogrupo C. Naquele momento, o quadro epidemiológico se caracterizava pela emergência da linhagem hipervirulenta do grupo A4 na população, em substituição à linhagem hipervirulenta do Complexo ET-37. Essa mudança esteve intimamente vinculada à mudança de fenótipos das cepas de meningococo, com o aumento da prevalência de cepas C:2b:P1.5,2 em substituição ao fenótipo C:2b:NSST (BERRÓN et al., 1998; ALCALÁ et al., 2002).

Uma mudança recente na epidemiologia da doença foi também bem documentada no Canadá. Um surto localizado de Doença Meningocócica, ocorrido na cidade de Victória, no estado de Ontário, durante os anos de 1988 e 1989,

causado por cepas de fenótipo C:2a:P1.5,2, foi seguido pela disseminação da cepa por todo estado e por um aumento da incidência da doença pelo sorogrupo C em todo o Canadá. Os estudos de epidemiologia molecular demonstraram que se tratava de um novo clone virulento, o ET-15 variante do Complexo ET-37, e que sua emergência foi responsável por uma mudança na situação epidemiológica da doença que se mantém desde o ano 2000 até o presente momento (ASHTON et al., 1991; WHALEN et al., 1995; JELFS et al., 2000; TSANG et al., 2004).

A disseminação deste clone virulento, o ET-15, foi também detectada na República Tcheca em 1993, onde não só esteve associado ao aumento da incidência da doença pelo sorogrupo C, provocando surtos, como também esteve associado a mudanças na gravidade da doença, que passou a apresentar quadros clínicos com alta incidência da síndrome de Waterhouse-Friderichsen, compreendendo choque séptico fulminante com quadro de necrose hemorrágica da supra-renal, púrpura disseminada e insuficiência cardíaca (KRIZOVA & MUSILEK, 1995).

No Brasil, o comportamento da doença seguiu este mesmo padrão, já observado em outros países, ou seja, começou a ser detectado, a partir de 1990 um aumento progressivo do número de casos endêmicos de Doença Meningocócica por *N. meningitidis* C, assim como de surtos e epidemias causados por este sorogrupo, em várias localidades brasileiras, associados especialmente ao fenótipo C:2b:P1.3, pertencente à linhagem hipervirulenta do Grupo A4 (CAUGANT 1998; SACCHI et al., 1992,1994,1995; DONALISIO et al., 2000; PURICELLI et al. 2004).

Especificamente, na Grande São Paulo, o monitoramento epidemiológico das cepas de *N. meningitidis* circulantes evidenciou que, durante os últimos 27 anos (1976 a 2003), ocorreram importantes mudanças nos fenótipos prevalentes de

*N. meningitidis* sorogrupo C responsáveis por casos de Doença Meningocócica. O fenótipo C:2a:P1.2 foi o prevalente entre as cepas sorogrupo C durante o período de 1976 a 1989 (14 anos) quando foi responsável por vários surtos (MORAES et al., 1975; SACCHI et al., 1992,1995). No fim dos anos 80, houve a introdução de cepas de meningococo sorogrupo C com fenótipo 2b:P1.3 que, substituindo o fenótipo anterior, circulou na população, causando surtos importantes em vários estados brasileiros, durante sete anos, correspondendo ao período de 1990 a 1997 (SACCHI et al., 1992; 1995). Em 1996, nova mudança de fenótipo foi observada, com a substituição crescente das cepas C:2b:P1.3 por cepas C:NST:NSST. Esta última mudança foi deveras interessante, pois o fenótipo C:2b:P1.3 praticamente desapareceu da população, não sendo mais isolado desde 2001; e o fenótipo C:NST:NSST começou a crescer vertiginosamente passando de uma prevalência de 9,1%, entre as cepas sorogrupo C isoladas em 1996, para 88,4% em 2003, Gráfico 1. Concomitantemente ao surgimento deste novo fenótipo, observou-se no ano de 2003, a inversão da prevalência dos sorogrupos de *N. meningitidis* causadores de doença no Estado de São Paulo, passando o sorogrupo C a representar 60% dos casos e o sorogrupo B, 40%. Este fenômeno que há muito não era visto em nosso meio, pois desde o final dos anos 80, o sorogrupo B vem sendo o responsável pela maioria dos casos de Doença Meningocócica em muitos estados brasileiros. Até o momento esta mudança está restrita ao Estado de São Paulo.

Assim, em 2001, aproximadamente 70% das cepas de *N. meningitidis* C recebidas da região da Grande São Paulo eram NST:NSST, isto é, não tipáveis. Tomou-se necessário portanto, o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais para caracterização fenotípica dessas cepas e, deste modo, este trabalho descreve, também, a caracterização de dois novos epítomos: o de sorotipo



23 e o de soro-subtipo P1.14-6, associados à emergência de um novo clone circulante na região.

A técnica de produção de MAbs, que é extremamente laboriosa, foi uma etapa decisiva deste trabalho pois nos permitiu a completa caracterização do fenótipo emergente; os MAbs serão utilizados rotineiramente na caracterização das cepas de meningococo que circulam no Brasil e os clones de células estarão à disposição da comunidade internacional, constituindo uma ferramenta adicional para o monitoramento global dos clones de meningococo.

Técnicas adicionais foram usadas, neste trabalho, para completa caracterização dos MAbs produzidos. Para o anticorpo monoclonal contra a classe 2, foi possível demonstrar a especificidade do MAb da linhagem celular F29-1G1/1B4 com uso do sequenciamento do gene *porB* que nos possibilitou a confirmação e localização do epítipo ao qual denominamos de sorotipo 23.

O seqüenciamento da proteína de classe 1 possibilitou-nos conhecer a existência de um único resíduo de metionina em uma posição tal que divide a proteína em dois fragmentos distintos, separando as regiões variáveis VR1 e VR2. Baseado nesse conhecimento e nas propriedades químicas do brometo de cianogênio (CNBr), descritas previamente (GROSS, E. & WITKOP, B., 1962), foi possível demonstrar a especificidade do MAb da linhagem celular F29-8H11/1E11. De fato, a proteína PorA foi clivada pelo brometo de cianogênio na única metionina localizada entre as regiões VR1 e VR2, resultando em dois fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida a 12% resultando em bandas de aproximadamente 16kDa para VR1 e 25kDa para VR2. Os fragmentos foram submetidos à reação de immunoblotting com o novo

MAB que reagiu com o fragmento de 25kDa contendo a VR2, sabidamente do tipo P1.14-6, Figura 6. O novo MAB então pode ser referido como MAB P1.14-6.

Com o emprego dos novos MABs, foi possível caracterizar, retrospectivamente, 75% ( $n=191$ ) das cepas C:NST:NSST responsáveis pelos casos de Doença Meningocócica no período de 1990 a 2003, como C:23:P1.14-6, restringindo a apenas 1,57% a proporção de cepas C não sorotipáveis.

Analisando as cepas ainda não soro-subtipáveis com os novos Mabs, verificou-se que 55 amostras apresentaram-se com fenótipo C:23:NSST e quatro foram completamente não sorotipáveis ou seja, C:NST:NSST, perfazendo um total de 59 cepas com caracterização incompleta. A presença de diferentes epítomos nas regiões variáveis da proteína PorA ou, ainda, diferentes níveis de expressão da proteína PorA poderiam explicar a ausência de reatividade do MAB P1.14-6 com essas 59 cepas. De fato, as regiões variáveis de 13 entre 14 cepas que não foram reconhecidas por esse novo anticorpo monoclonal, apresentavam diversidade de seqüências de nucleotídeos, apesar de expressarem proteínas PorA em níveis normais, caracterizando assim, epítomos diferentes daquele que induziu a produção do anticorpo. Esta diversidade de seqüências explica, portanto, a falta de reatividade com o MAB P1.14-6. Entretanto, uma outra cepa, pertencente ao grupo dessas 14, apresentou a seqüência da VR2 da proteína PorA idêntica à da cepa protótipo a partir da qual foi produzido o anticorpo monoclonal, ou seja, apresentou o epítomo P1.14-6. Portanto como esperado, esta cepa seria reconhecida pelo anticorpo, porém, este fato não ocorreu. A incapacidade de MABs em reconhecerem os epítomos idênticos aos das cepas protótipos tem sido descrita por outros autores, que apontam como fatores prováveis a presença de uma cápsula excessivamente desenvolvida ou de um tipo de lipopolissacarídeo, que podem

mascarar os epítomos de PorA, dificultando assim a reatividade com os MABs (SACCHI et al., 2000; ALCALÁ et al., 2004). Eventos genéticos como inserções ou deleções nos genes *porA* podem levar a novas configurações da molécula e, por conseguinte, a diferentes exposições do epítomo na proteína, o que pode dificultar e até mesmo impedir o reconhecimento deste pelo MAb (FEAVERS et al., 1996; MAIDEN et al., 1992; SUKER et al., 1994, 1996).

Dentre as 20 cepas, que quando analisadas para presença de proteína PorA, apresentaram baixa expressão protéica, em 17 delas foi detectada a presença do epítomo P1.14-6, significando que poderiam ter sido caracterizadas fenotipicamente com o novo MAb P.14-6, se não fosse a pouca expressão da proteína de classe 1 nessas cepas. Vários estudos demonstraram que a expressão de PorA pode ser alterada por múltiplos mecanismos genéticos, funcionando como importante mecanismo de escape da bactéria ao sistema imune do hospedeiro, pois a proteína PorA é um dos principais alvos dos anticorpos bactericidas induzidos em resposta ao ataque bacteriano. Tem sido demonstrado que os principais mecanismos responsáveis por mudanças na expressão da proteína envolvem o comprimento e a composição do espaço do trato homopolimérico de guanidina (polyG) e/ou timina entre os domínios -10 e -35 do promotor do gene *porA*, bem como a variação do comprimento do trato homopolimérico de adenina (polyA) na região codificadora da proteína (SAWAYA et al., 1999; van der ENDE et al., 1995, 2000).

Entre as 59 cepas que não foram reconhecidas pelo anticorpo, detectou-se que 25 delas não expressavam a proteína PorA; porém, por meio de seqüenciamento pode-se demonstrar que 21 cepas carregavam informações genéticas para codificação do epítomo P1.14-6. Os eventos genéticos como

mutações pontuais na região que codifica a proteína PorA podem resultar em meningococo sem expressão de PorA, o que não inviabiliza a transmissão e / ou patogenicidade da bactéria. Este fato já foi observado em 2001 na Holanda, onde ocorreram surtos da Doença Meningocócica por cepas deficientes de proteína PorA (ARHIN et al., 1998; van der ENDE et al., 2000, 2003). A não expressão da proteína PorA pode também estar associada à deleção completa do gene *porA* pela presença de um codon de término (*stop codon*) prematuro (van der ENDE et al., 1999) ou mesmo pela presença de um elemento de inserção na região codificadora da proteína (NEWCOMBE et al., 1998). Assim, vários podem ter sido os mecanismos que levaram ao não reconhecimento de uma parcela das cepas sorogrupo C pelo anticorpo P1.14-6. Não fossem essas particularidades, quase a totalidade das amostras poderiam ter sido caracterizadas com a introdução do MAb P1.14-6 na rotina, uma vez que as 39 cepas NSST, possuíam informações genéticas para codificação do epítopo P1.14-6.

Pela análise das seqüências das regiões variáveis da proteína PorA, entre as 62 cepas selecionadas randomicamente contemplando os quatro fenótipos prevalentes no período, Tabela 7, observou-se que dois fenótipos possuíam regiões variáveis idênticas, ou seja, cepas de fenótipo C:2b:P1.3 e C:2b:NSST continham VRs de mesmo tipo P1.18-1,3. Por outro lado, todas as cepas C:2a:P1.2 apresentavam VRs de tipo P1.5,2 e todas as cepas de fenótipo C:23:P1.14-6 apresentavam VRs do tipo P1.22-14-6. Ao contrário do esperado, estes resultados sugerem uma forte conservação do gene *porA* ao longo destes 13 anos (1990 a 2003), uma vez que estas regiões do DNA normalmente mostram alta variabilidade como um mecanismo de escape do sistema imunológico do hospedeiro (FEAVERS et al., 1992a, 1996). Estes dados são também corroborados pelas observações feitas por ARHIN et al., 1998, que seqüenciaram VRs da proteína PorA. Os autores

sugerem que as combinações de famílias de VRs não se dão aleatoriamente, mas sim, de forma que ocorram associações preferenciais entre as famílias de VRs. Curiosamente, as cepas que apresentaram VRs tipo P1.18-1,3 não reagiu com o MAb P1.3, ficando fenotipicamente classificadas como C:2b:NSST. De forma semelhante, nenhuma das cepas C:2a:P1.2 reagiu com o MAb P1.5, embora todas possuíssem VRs de tipo P1.5,2. Os motivos que levam à falta de reatividade do MAb com seu epítipo protótipo já foram mencionados anteriormente, podendo estar relacionados à quantidade de polissacarídeo capsular e ao tipo de lipopolissacarídeo ou mesmo aos mecanismos genéticos que mascaram o epítipo, dificultando o seu reconhecimento pelo MAb.

Recentemente, a técnica do seqüenciamento do gene 16S RNA ribossomal foi utilizada para caracterizar as cepas de *N. meningitidis*. O benefício epidemiológico desta nova técnica foi demonstrado em investigações de surtos e epidemias causadas pelos sorogrupos B, C e W135 (MAYER et al., 2002; SACCHI et al., 2002).

Fenômeno peculiar pode ser observado com relação ao tipo 125 do 16S que apresentou nas posições 64, 179, 182 e 441 uma citosina ou timina, alternadamente e na posição 222 adenina ou guanina, Tabela 8. Esta alternância de bases pode ser explicada pelo fato da *N. meningitidis* apresentar quatro operons diferentes de rRNA (TETTELIN et al., 2000), podendo assim, em uma reação de polimerase em cadeia, amplificar produtos com combinações de nucleotídeos diferentes nas posições sob responsabilidade desses operons, o que explicaria as bases alternadas que foram encontradas e que classicamente são designadas de *mixed bases*.

Surpreendentemente, foi observado que houve uma forte associação entre os tipos de 16S e os fenótipos de sorotipos e soro-subtipos. Todas as cepas C:NST:NSST que foram classificadas como C:23:P1.14-6 pela reatividade com os MAbs 23 e P1.14-6 e classificadas adicionalmente como C:23:P1.22,14-6 pela tipagem das regiões variáveis da proteína PorA (22,14-6), apresentaram 16 S do tipo 17. As cepas com fenótipo C:2b:P1.3 e com as regiões variáveis dos tipos VR1-18 e VR2-3 apresentaram estreita correlação com o 16S do tipo 91 com apenas uma única cepa, N.496/96, apresentando 16S do tipo 125, Tabela 7.

A maioria das cepas C:2a:P1.2 apresentou 16S do tipo 13, sendo que, apenas a cepa N.1180/95 demonstrou 16S tipo 145, Tabela 7. Estes tipos, 13 e 145 se apresentam como tipos relacionados filogeneticamente, conforme demonstrado pelo dendrograma, Figura 8.

Quando analisadas por seqüenciamento das regiões variáveis da PorA, todas as cepas C:2a:P1.2, apresentaram regiões variáveis de mesmos tipos ou seja, VR1-5 e VR2-2, entretanto nenhuma delas foi reconhecida pelo MAb P1.5. As cepas C:2b:NSST apresentaram, curiosamente, 16S do tipo 91, igual às cepas C:2b:P1.3 e regiões variáveis da proteína PorA com epítomos de VR1-18 e VR2-3, embora não tenham reagido com o MAb P1.3, Tabela 7. Os motivos que levariam à falta de reatividade MAbs P1.5 e P1.3 com seus epítomos protótipos já foram mencionados anteriormente.

O uso do seqüenciamento de 16S RNA ribossomal nesse trabalho, permitiu determinar para esse fenótipo emergente, um tipo particular de 16 S, o tipo 17, nunca antes descrito na literatura e que se mostrou completamente distinto dos padrões de 16S apresentados pelos fenótipos C:2b:P1.3 e C:2a:P1.5,

classicamente associados ao Grupo A4 e ao Complexo ET-37, respectivamente (CAUGANT, 1998), Figura 8. Portanto, o fenótipo C:23:P1.14-6 apresenta características moleculares específicas, nunca antes relatadas.

A caracterização de cepas de *N. meningitidis* em sorotipos e soro-subtipos tem como principal objetivo fornecer dados que poderão auxiliar no entendimento dos processos epidemiológicos da Doença Meningocócica. O conhecimento das características antigênicas das cepas circulantes num determinado período de tempo e numa área geográfica definida é também de fundamental importância para as ações de controle da doença, incluindo o desenvolvimento de vacinas.

Por razões relativas ao custo-benefício e por questões de complexidade técnica da tipagem genotípica, a sorotipagem ainda é o método de escolha para estudos epidemiológicos. Portanto, quanto mais anticorpos monoclonais tivermos à disposição para caracterização das cepas, maiores serão as informações sobre a dinâmica das populações bacterianas circulantes em nosso meio, para subsidiar a elaboração de estratégias de controle e prevenção da Doença Meningocócica.

Contudo, para o estudo da epidemiologia regional e global da Doença Meningocócica e para o estudo evolucionário do agente etiológico, são necessários os passos adicionais que serão buscados a seguir, ou seja, o estudo do clone ancestral do novo fenótipo prevalente entre as cepas de meningococo sorogrupo C, visando também analisar seu parentesco filogenético com as linhagens hipervirulentas responsáveis pela maioria dos casos de Doença Meningocócica no mundo.

Os dados aqui apresentados, demonstram a circulação de um novo fenótipo com alta prevalência entre as cepas sorogrupo C, associado ao aumento dos

Coeficientes de Incidência da Doença Meningocócica pelo sorogrupo C, indicando que uma nova situação epidemiológica da Doença Meningocócica está se delineando na Grande São Paulo. Por conseguinte, poderá ter implicações mais abrangentes, tanto do ponto de vista epidemiológico como no âmbito das necessidades de novas estratégias de controle e prevenção da Doença Meningocócica a serem adotadas no país em futuro próximo, para o controle de epidemias na população, pois se trata de fenótipo ainda não descrito na comunidade internacional.



## **6. CONCLUSÃO**

1. Foram selecionadas as linhagens híbridas F29-8H11/1E11 e F29-1G1/1B, que secretam o MAb P1.14-6 e o MAb 23, com especificidade para as proteínas PorA e PorB, respectivamente.
2. A tipagem das regiões variáveis dos genes *porA* e *porB*, por seqüenciamento, confirmou a presença de regiões de tipos VR1.14-6 e VR3-23 contendo os epítomos protéicos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais de soro-subtipo e de sorotipo, designados MAb P1.14-6 e MAb 23, respectivamente.
3. A análise da diversidade das seqüências do gene 16S RNA Ribossomal mostrou forte associação entre fenótipos e tipos de 16S, sendo que o fenótipo emergente C:23:P1.14-6, encontra-se associado ao tipo 17.
4. Utilizando-se métodos fenotípicos e genotípicos foi possível caracterizar os epítomos de sorotipo e de soro-subtipo das cepas C:NST:NSST como 23 e P1.14-6, respectivamente, ficando definido como C:23:P1.14-6 o fenótipo do novo clone de meningococo e apresentando tipo 17 de 16S RNA ribossomal, nunca antes descrito na literatura, associado ao aumento da prevalência de cepas sorogrupo C na Grande São Paulo.

## **7. RESUMO**

Infecções por *Neisseria meningitidis* estão associadas a altos índices de morbimortalidade no mundo. Na Região da Grande São Paulo a Doença Meningocócica (DM) causada por *Neisseria meningitidis* sorogrupo C começou a se tornar prevalente em 2001, representando, em 2003, 62,7% de todos os casos de DM sorogrupados sendo que aproximadamente 88,5% dessas cepas eram não sorotipados e não sorosubtipados (C:NST:NSST).

Estes dados sugeriam que um fenótipo, C:NST:NSST, tinha emergido na Grande São Paulo e, considerando-se a importância histórica da doença na região, iniciamos o presente estudo com o objetivo de esclarecer a mudança na dinâmica da DM pela determinação das características fenotípicas e genotípicas destas cepas.

Para tanto, analisamos por sorotipagem, tipagem das regiões Variáveis da PorA e PorB e do gene 16S RNA ribossomal, 753 cepas de *N. meningitidis* C isoladas de casos de DM provenientes da Grande São Paulo, no período de 1990 a 2003. Dado a impossibilidade de caracterização do novo fenótipo pelos anticorpos monoclonais disponíveis mundialmente, objetivamos também a produção de hibridomas produtores desses anticorpos para caracterização do fenótipo C:NST:NSST.

Foram selecionadas duas linhagens celulares híbridas, produtoras de anticorpos monoclonais que reconhecem as proteínas PorA e PorB deste novo fenótipo. Entre as 255 cepas de *N. meningitidis* C inicialmente caracterizadas como NST:NSST, 75% ( $n=191$ ) tomaram-se completamente sorotipadas como 23:P1.14-6. A análise da similaridade do gene 16S RNA ribossomal das cepas analisadas demonstrou um único padrão genético, sugerindo a clonalidade deste novo fenótipo.

Os dados obtidos neste trabalho, demonstram a introdução, na Região da Grande São Paulo, de um novo clone de *Neisseria meningitidis* C apresentando o fenótipo C:23:P1.14-6 e que está sendo responsável pelo aumento dos casos de DM causada por este sorogrupo.

## **8. ABSTRACT**

*Neisseria meningitidis* (Men) is an important cause of morbidity and mortality and is a leading cause of bacterial meningitis and septicemia in children and young adults in Brazil. Meningococcal disease caused by MenC started becoming the most prevalent serogroup in 2001, representing 62.7% of all MD cases serogrouped in 2003 in Greater São Paulo and approximately 88.5% of MenC isolates were non-serotypeable and non-serosubtypeable (NST:NSST).

This data suggested that a novel invasive isolate (C:NT:NSST) had emerged in GSP, and considering the historical importance of MenC disease in the region, we initiated this study to better understand the dynamics of MD looking at the phenotypic and molecular characteristics of these isolates.

To accomplish this goal, we characterized 753 MenC isolates recovered during the period of 1990 to 2003 by serotyping, PorB and PorA VR typing, 16S rRNA gene typing and produced new serotyping monoclonal antibodies (MAbs) to characterize the C:NST:NSST isolates.

We were able to select two hybridoma cells that recognizes PorB and PorA proteins. Among the 255 strains initially characterized as NST:NSST, 75% ( $n=191$ ) of them became completely serotyped as 23:P1.14-6. By 16S RNA ribosomal typing, these strains showed the same pattern suggesting strain clonality.

Our data demonstrate the introduction of a new clone of *Neisseria meningitidis* C presenting the phenotype C:23:P1.14-6 and that is being responsible for the increase of the cases of DM caused by this serogroup in Great São Paulo.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- ABDILLAHI, H. & POOLMAN, J. T. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.48, p.367-371, 1987.
- ACHTMAN, M. Clonal spread of serogroup A meningococci: a paradigm for the analysis of microevolution in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v.11, p.15-22, 1994.
- ACHTMAN, M. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. **Trends Microbiol.**, v.3, p.186-192, 1995.
- ALCALÁ, B., ARREAZA, L., SALCEDO, C., URÍA, M. J., DE LA FUENTE, L., VAZQUEZ, J. A. The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. **J. Med. Microbiol.**, v.51, p.1102-1106, 2002.
- ALCALÁ, B., SALCEDO, C., ARREAZA, L., ABAD, R., ENRIQUEZ, R., DE LA FUENTE, L., URÍA, M. J., VAZQUEZ, J. A. Antigenic and/or phase variation of PorA protein in non-subtypeable *Neisseria meningitidis* strains isolates in Spain. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.515-518, 2004.
- ARHIN, F. F., MOREAU, F., COULTON, J. W., MILLS, E. Sequencing of *porA* from clinical isolates of *Neisseria meningitidis* defines a subtyping scheme and its genetic regulation. **Can. J. Microbiol.**, v.44, p.56-63, 1998.
- ASHTON, F. E., RYAN, J. A., BORCZYK, A., CAUGANT, D. A., MANCINO, L., HUANG, D. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis* serotype 2a that is associated with meningococcal group C disease in Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p.2489-2493, 1991.
- AYALA P., LIN, L., HOPPER, S., FUKUDA, M., SO, M. Infection of epithelial cells by pathogenic *Neisseriae* reduces the level of multiple lysosomal constituents. **Infect. Immun.**, v.66, p.5001-5007, 1998.
- BART, A., BARNABÉ, C., ACHTMAN, M., DANKERT, J., VAN DER ENDE, A., TIBAYRENC, M. The population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A fits the predictions for clonality. **Infect. Gen. Evol.**, v. 1, p.117-122, 2001.
- BASH, M. C., LESIAK, K. B., BANKS, S. D., FRASCH, C. E. Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques. **Infect. Immun.**, v.63, p.1484-1490, 1995.
- BERRÓN, L., DE LA FUENTE, L., MARTIN, E., VAZQUEZ, J. A. Increasing incidence of meningococcal disease in Spain associated with a new variant of serogroup C. **Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.**, v.17, p.85-89, 1998.

- BJUNE, G., HOIBY, E. E., GRONNESBY, J. K., ARNESEN, O., FREDRIKSEN, J. H., HALTSTENSEN, A., HOLTEN, E., LINDBAK, A. K., NOKLEBY, H., ROSENQVIST, E., SOLBERG, L. K., CLOSS, O., FROHOLM, L. O. LYSTAD, A., BAKKETEIG, L. S., HAREID, B. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. **Lancet.**, v.338, p.1093-1096, 1991.
- BRADBURY, J. New meningitis C vaccine to be used in UK. **Lancet.**, v.354, p.337-352, 1999.
- BRICKS., L. F. Critical analysis of old and new vaccines against *N. meningitidis* serogroup C, considering the meningococcal disease epidemiology in Brazil. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.**, v.58, p.231-240, 2003.
- BRUNDAGE, J. F. & ZOLLINGER, W. D. Evolution of meningococcal disease epidemiology in the U.S. Army. In: Vedros, N.A. (Ed.): Evolution of meningococcal disease. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida 1987, v.1, p.99-119.
- BUTCHER, S., SARVAS, M., RUNENBERG-NYMAN, K. Class-3 porin protein of *Neisseria meningitidis*: cloning and structure of the gene. **Gene**, v.105, p.125-128, 1991.
- BYGRAVES, J. A. & MAIDEN, M. C. J. Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. **J. Gen. Microbiol.**, v.138, p.523-531, 1992.
- BYGRAVES, J. A., URWIN, R., FOX, A. J., GRAY, S. J., RUSSEL, J. E., FEAVERS, I., MAIDEN, M. C. J. Population genetic and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex. **J. Bacteriol.**, v. 181, p.5551-5556, 1999.
- CAUGANT, D. A., FROHOLM, L. O., BOVRE, K., HOLTEN, E., FRASCH, C. E., MOCCA, L. F., ZOLLINGER, W. D., SELANDER, R. K. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.83, p. 4927-4931, 1986.
- CAUGANT, D. A., FROHOLM, L. O., BOVRE, K., HOLTEN, E., FRASCH, C. E., MOCCA, L.F., ZOLLINGER, W. D., SELANDER, R. K. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. **Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.**, v.53, p.389-394, 1987.
- CAUGANT, D. A., BOL, P., HOIBY, E. A., ZANEN, H C. FROHOLM, L. O. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in the Netherlands, 1858 through 1986. **J. Infect. Dis.** v.162, p.867-874, 1990.
- CAUGANT, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **Apmis.**, v.106, p.505-525, 1998.

- CLAUS, H., STOEVE SANDT, J., FROSCHE, M., VOGEL, U. Genetic isolation of meningococcal of the electrophoretic type 37 complex. **J. Bacteriol.**, v. 183, p.2570-2575, 2001.
- CLAUS, H., MAIDEN, M.C.J., MAAG, R., FROSCHE, M. VOGEL U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. **Microbiol.**, v. 148, p.1813-1819, 2002.
- CORBETT, A., EXLEY, R., BURDOULOUS, S., TANG, C. Interactions between *Neisseria meningitidis* and human cells that promote colonization and disease. **Expert Rev.**, Cambridge, v.6, p.1-13, 2004.
- DEVOE, I. W. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.46, p. 162-190, 1992.
- DEVOE I. W. & GILCHRIST, J. E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, v.138, p.1156-67, 1973.
- De VRIES, F.P., COLE, R., DANKERT, J., FROSCHE, M., Van PUTTEN, J.P., *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. **Mol. Microbiol.**, v.27, p.1203-1212, 1998.
- DIERMAYER, M., HEDBERG, K., HOESLY, F., PERKINS, B., REEVES, M., FLEMING, D. Epidemic serogroup B meningococcal in Oregon: the evolving epidemiology of the ET-5 strain. **JAMA.** v.281, p.1493-1497, 1999 .
- DONALISIO, M. R. C., KEMP, B., ROCHA, M. M. M. RAMALHEIRA, R. M. F. Letalidade na epidemiologia da doença meningocócica: estudo na região de Campinas, SP. 1993-1998. **Rev. Saude Publica**, v.34, p.589-595, 2000.
- DORSET, D. L., ENGEL, A., MASSALS, A. A., ROSENBUSCH, J. P. Three dimensional structure of a membrane pore. **Biophys. J.**, v.45, p.128-129, 1984.
- DYET, K. H., SIMMONDS, R. S., MARTIN, D. R. Multilocus restriction typing to predict the sequence type of meningococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p. 1742-1745, 2004.
- EDEN, P.A., SCHMIDT, T. M., BLAKEMORE, R. P., PACE, N. R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotactium* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, p.324-325, 1991.
- ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.**, v.7, p.482-487, 1999.

- ESTABROOK, M. M., GRIFFISS, J. M., JARVIS, G. A. Syalylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. **Infect. Immun.**, v.65, p. 4436-4444, 1997.
- FEAVERS, I. M., HEATH, A. B., BYGRAVES, J. A., MAIDEN, M. C. Role of horizontal genetic exchange in the antigenic variation of the class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.489-495, 1992a.
- FEAVERS, I. M., SUKER, J., MCKENNA, A. J., HEATH, A. B., MAIDEN, M. C. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v.60, p.3620-3629, 1992b.
- FEAVERS, I. M., FOX, A. J., GRAY, S., JONES, D. M., MAIDEN, M. C. Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has implications for epidemiology analysis and vaccine design. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.3, p.444-450, 1996
- FEAVERS, I. M., GRAY, S. J., URWIN, R., RUSSEL, J. E., BYGRAVES, J. A., KACZMARSKI, E. B., MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.3883-3887, 1999.
- FEIL, E. J., MAIDEN, M. C. J., ACHTMAN, M., SPRATT, B. G. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Biol. Evol.**, v.16, p.1496-1502, 1999.
- FEIL, E. J., HOLMES, E. C., BESSEN, D. E., CHAN, M. S., DAY, N. P. J., ENRIGHT, M. C., GOLDSTEIN, R., HOOD, D. W., KALIA, A., MORRE, C. E., ZHOU, J., SPRATT, B. G. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic comparisons. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.98, p.182-187, 2001.
- FRASCH, C. E. & CHAPMAN, S. S. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. I Serological typing by a microbactericidal method. **Infect. Immun.**, v.5, p.98-102, 1972a.
- FRASCH, C. E. & CHAPMAN, S. S. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. II Extraction of type-specific antigens for serotyping by precipitin techniques. **Infect. Immun.**, v.6, p.127-133, 1972b.
- FRASCH, C. E. & MOCCA, L. F. Heat-modifiable outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and their organization within the membrane. **J. Bacteriol.**, v.136, p.1127-1134, 1978.
- 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.

- FRASCH, C. E., TSAI, C., MOCCA, L. F. Outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: structure and importance in meningococcal disease. **Clin. Invest. Med.**, v.9, p.101-107, 1986.
- GOLD, R. & WYLE, F. A. New classification of *Neisseria meningitidis* by means of bactericidal reactions. **Infect. Immun.**, v.1, p. 479-484, 1970.
- GOLDSHNEIDER, 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, 1969.
- GUIBOURDENCHE, M., HOIBY, E. A., RIOU, J-Y., VARAINE, F., JOGUET, C., CAUGANT, D. A. Epidemics of serogroup A *Neisseria meningitidis* of subgroup III in Africa. **Epidemiol. Infect.**, v.116, p.115-120, 1996.
- GRIFFISS, J. M., SCHENEIDER, H., MANDRELL, R. E., YAMASAKI, R., JARVIS, G. A., KIM, J. J., GIBSON, B. W., HAMADEH, R., APICELLA, M. A. Lipooligosaccharide: the principal glycolipids of the Neisserial outer membrane. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, suppl. 2, p.287-295, 1988.
- GRODET, C., DEQUIN, P. F., WATT, S., LANOTTE, P., GIALLULY, C., TAHA, M. K., ALONSO, J. M., QUENTIN, R., GOUDEAU, A., MEREGHETTI, L. Outbreak in France of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.12 belonging to sequence type 1403. **Clin. Microbiol. Infect.**, p.1-3, 2004.
- GROSS, E. & WITKOP, B. Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residue in bovine pancreatic ribonuclease. **J. Biol. Chem.**, v.237, p.1856, 1962.
- HJETLAND, R., CAUGANT, D. A., HOFSTAD, T., FROHOLM, L. O., SELANDER, R. K. Serogroup A *Neisseria meningitidis* of clone III-I present in Western Norway as early as 1969-73. **Scand J. Infect. Dis.** v. 22, p. 241-142, 1990.
- JACKSON, L. A., SCHUCHAT, A., REEVERS, M., W., WENGER, J. D. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States: an emerging threat. **JAMA**, v.273, p.383-389, 1995.
- JACOBSSON, S., ISSA, M., UNEMO, M., BACKMAN, A., MOLLING, P., SULAIMAN, N., OLCÈN, P. Molecular characterization of group A *Neisseria meningitidis* isolated in Sudan 1985-2001. **Apmis.**, v.111, p.1060-1066, 2003.
- JARVIS, G. A. & GRIFISS, J. M. Human IgA1 blockade of IgG-initiated lysis of *Neisseria meningitidis* is a function of antigen-binding fragment binding to the polysaccharide capsule. **J. Immunol.** v.147, p.1962-1970, 1991
- JELFS, J., MUNRO, R., WEDEGE, E., CAUGANT, D. A. Sequence variation in the porA gene of a clone of *Neisseria meningitidis* during epidemic spread. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.7, p.390-395, 2000.

- JOLLEY, K. A., KALMUSOVA, J., FEIL, E. J., GUPTA, S., MUSILEK, M. KRIZ, P., MAIDEN, M. J. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.4492-4498, 2000.
- KRIZOVA, P. & MUSILEK, M. Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech Republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2 (P1.5), ET-15;37. **Cent. Eur. J. Public Health**, v.4, p.189-194, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEMOS, A. P. S., SACCHI, C. T., PAIVA, M. V., YARA, T. I., MELLES, C. E. A., MAYER, L. W. Genetic relationships among serogroup B:serotype 4 *Neisseria meningitidis* strains. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.43, p.119-124, 2001.
- LEWIS, C & CLARKE, S. C. Identification of *Neisseria meningitidis* serogroups Y and W135 by *siaD* nucleotide sequence analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.2697-2699, 2003.
- LINZ, B., SCHENKER, M., ZHU, P. ACHTMAN, M. Frequent interspecific genetic exchange between commensal neisseriae and *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v.36, p.1049-1058, 2000.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, J. N., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagents. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- LYNCH, E. C., BLAKE, M. S., GOTSCHLICH, E. C., MAURO, A. Studies of porins spontaneously transferred from whole cells and reconstituted from purified proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. **Biophys. J.**, New York, v.45, p.104-107, 1984.
- LYSTAD, A. & AASEN, S. The epidemiology of meningococcal disease in Norway 1975-91. **NIPH ANN.**, v.14, p.57-66, 1991.
- MACHADO, M. L'epidemie de meningite cerebrospinale au Brésil. **Méd. Hyg.**, v. 34, p.483-485, 1976.
- MAIDEN, M. C., SUKER, J., MCKENNA, A. J., BYGRAVES, J. A., FEAVERS, I. M. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v.5, p.727-736, 1991.
- MAIDEN, M. C. J. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.112, p.243-250, 1993.
- MAIDEN, M. C. J., BYGRAVES, J. A., MCCARVIL, J., FEAVERS, I. M. Identification of meningococcal serosubtypes by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.2835-2841, 1992

- MAIDEN, M. C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSEL, J. E., URWIN R., ZHANG, Q., ZHOU, J. ZURTH, K., CAUGANT, D. A., FEAVERS, I. M., ACHTMAN M., SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.3140-3145, 1998.
- MAIDEN, M. C. J. & SPRATT, B. Meningococcal conjugate vaccines: new opportunities and new challenges. **The Lancet.**, v.354, p.615-615, 1999.
- MARIE, S., HOEIJMAKERS, J. H., J., POOLMAN, J. T., ZANEN, H. C. Filter radioimmunoassay, a method for large scale serotyping of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.20, p.255-258, 1984.
- MARTIN, D. R., WALKER, S. J., BAKER, M. G., LENNON, D. R. New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B:4:P1.4. **J. Infect. Dis.**, v.177, p.497-500, 1998.
- MASLOW, J. N., MULLIGAN, M. E., ARBEIT, R. D., Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, v.17, p.153-164, 1993.
- MASLOW, J. & MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.9, p.595-604, 1996.
- MAYER, L. W., REEVERS, M. W., AL-HAMDAN, N. SACCHI, C. T., TAHA, M. K., AJELLO, G. W., SCHIMINK, S. E., NOBLE, C. A., TONDELLA, M. L., C., WHITNEY, A. M., AL-MAZROU, Y. , AL-JEFRI, M., MISHKHIS, A., SABBAN, S., CAUGANT, D. A., LINGAPPA, J., ROSENSTEIN, N. E. POPOVIC, T. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000 : Not emergence of a new W135 strain but expansion within the electrophoretic type-37 complex. **J. Infect. Dis.**, v.185, p.1596-1605, 2002.
- McELLISTREM, M. C., KOLANO, J. A., PASS, M. A., CAUGANT, D. A., MENDELSON, A. B., PACHECO, A. G. F., SHUTT, K. A., RAZEQ, J., HARRISON, L. Correlating epidemiologic trends with the genotypes causing meningococcal disease, Maryland. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.451-456, 2004.
- McGUINNESS, B. T., BARLOW, A. K., CLARKE, I. N., FARLEY, J. E., ANILIONIS, A., POOLMAN, J. T., JONES, D. M., HECKELS, J. E. Deduced amino acid sequence of class 1 protein (PorA) from three strains of *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, v.171, p.1871-1882, 1990.
- McGUINNESS, B. T., LAMB DEN, P. R., HECKELS, J. E. Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implications for subtype definition and molecular epidemiology. **Mol. Microbiol.**, v.7, p.505-514, 1993.

- MOORE, P. S., REEVES, M. W., SCHWARTZ, B., GELIN, B., BROOME, C. V. Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. **Lancet** v.II. p. 260-262. 1989.
- MOORE, P. S. Meningococcal meningitis in Sub-Saharan Africa: A model for the epidemic process. **Clin. Infect. Dis.**, v.14, p.515-525, 1992.
- MORAIS, J. C., MUNFORD, R. S., RISI, J. B., ANTEZANA, E., FELDMAN, R. A. Epidemic disease due to serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v.129, p.568-571, 1974.
- MORELLI, G., MALORNY, B., MULLER, K., SEILER, A., WANG, J., DEL VALLE, J., ACHTMAN, M. Clonal descent and micro-evolution of *Neisseria meningitidis* during 30 years of epidemic spread. **Mol. Microbiol.**, v.25, p.1047-1064, 1997.
- MORELLO, J. A., JANDA W. M., DOERN G.V. *Neisseria* and *Branhamella*. In: BALLOWS, A., HANSLER, W. J. Jr., HERRMANN, K. L., ISENBERG H. D., SHADOMY H. J. eds. **Manual of Clinical Microbiology.**, 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p.258-76.
- MORLEY, S. L. & POLLARD, A. J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? **Vaccine**, v.20, p.666-687, 2002.
- MULKIS, M. H & PALUT G. IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless neisseriaceae. **N. Engl. J. Med.**, v.299, p.973-976, 1978
- MULLER-GRAF, C. D.M., WHATMORE, A. M., KING, S. J., TRZANSKI, K., PICKERILL, P., DOHERTY, N., PAUL, J., GRIFFITHS, D., CROOK, D., DOWSON, G. Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. **Microbiol.**, v.145, p.3283-3293, 1999.
- MURAKAMI, K., GOTSCHLICH, E. C., SEIFF, N. E. Cloning and characterization of the structural gene for the class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v.57, p.2318-2323, 1989.
- MURPHY, T. F. Antigenic variation of surface proteins as a survival strategy for bacterial pathogens. **Trends Microbiol.**, v.2, p.427-428, 1994.
- NEWCOMBE, J., CARTWRIGHT, K., DYER, S., McFADDEN, J. Naturally occurring insertional inactivation of the porA gene of *Neisseria meningitidis* by integration of IS1301. **Mol. Microbiol.**, v.30, p.453-454, 1998
- ORSKOV, F. & ORSKOV, I. J. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae* and other bacteria. **J. Infect. Dis.**, v.148, p.346-357, 1983.



- OLYHOEK, T., CROWE, B. A., ACHTMAN, M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. **Rev. Infect. Dis.**, v.9, p.665-695, 1987.
- PELTOLA, H. et al. Shift in the age-distribution of meningococcal disease as predictor of an epidemic? **Lancet**, v.2, p.595-597, 1982.
- POLLARD, A. J., PROBE, G., TROMBLEY, C., CASTELL, A., WHITEHEAD, S., BIGHAM, J. M., CHAMPAGNE, S., ISAAC-RENTON, J., TAN, R., GUIVER, M., BORROW, R., SPEERT, D., THOMAS, Evaluation of a diagnostic polymerase chain reaction assay for *Neisseria meningitidis* in North America and field experience during an outbreak. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.126, p.1209-1215, 2002.
- POOLMAN, J. T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect. Agents Dis.** v.4, p.13-27, 1995.
- POOLMAN, J. T. & BUCHANAN, T. M. Monoclonal antibodies against meningococcal outer membrane proteins. **Med. Trop.**, v. 43, p.139-142, 1983.
- POPOVIC, T., SCHMINK, S., ROSENSTEIN, N., AJELLO, G. W., REEVES, M. W., PLYKATIS, B., HUNTER, S. B., RIBOT, E. M., BOXRUD, D., TONDELLA, M. L. C., KIM, C., NOBLE, C., MOTHERSHED, E., BESSER, J., PERKINS, B. A. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. **J. Clin Microbiol.**, v. 39, p.75-85, 2001.
- PURICELLI, R. C. B., KUPEK, E., BERTONCINI, R. C. C. Controle se surto de meningite meningocócica do sorogrupo C no município de Corupá, Santa Catarina, Brasil, com ações rápidas e efetivas de vigilância epidemiológica e imunização. **Cad. Saúde Pública**, v.20, p.959-967, 2004.
- RACOOSIN, J. A., WHITNEY, C. G., CONOVER, C. S., DIAZ, P.S. Serogroup Y meningococcal disease in Chicago, 1991-1997. **JAMA**, v.280, p.2094-2098, 1998.
- REEVERS, M. W., PERKINS, B. A., DIERMAYER, M., WENGER, J. D. Epidemic-associated *Neisseria meningitidis* detected by multilocus enzyme electrophoresis. **Emerg. Infect. Dis.**, v.1, p.53-54, 1995
- RIEDO, F. X., PLIKAYTIS, B. D., BROOME, C. V. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.14, p. 643-657, 1995.
- RIOU, J. Y., SALIOU, P., GUIBOURDENCHE, M., CHALVIGNAC, M. A. Étude bactériologique et sérologique de 358 souches de *Neisseria* et *Branhamella* isolées em Haute-Volta. **Méd. Maladie Infec.**, v.10, p.430-439, 1980.

- ROSENSTEIN, N. E., STEPHENS, D., LEFKOWITZ, L., CARTTER, M. L., DANILA, R., CIESLAK, P., SHUTT, K. A., POPOVIC, T., SCHUCHAT, A., HARRISON, L. H., REINGOLD, A. L., AND THE ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE TEAM. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. **J. Infect. Dis.**, v.180, p.1894-1901, 1999
- ROSENSTEIN, N.E., PERKINS, B.A., STEPHENS, D.S., POPOVIC, T., HUGHES, J.M. Medical progress: Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v.244, p.1378-1388, 2001.
- RUSSEL, J. E., JOLLEY, K. A., FEAVERS, I. M., MAIDEN, M. C. J., SUKERT, J. PorA variable regions of *Neisseria meningitidis*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.674-678, 2004.
- SACCHI, C. T., PESSOA, L. L., RAMOS, S. R., MILAGRES, L. G., CAMARGO, M. C. C., HIDALGO, N. T., R., MELLES, C. E. A., CAUGANT, D. A., FRASCH, C. E. A. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET- 5 complex. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1734-1738, 1992.
- SACCHI, C. T., ZANELLA, R. C., CAUGANT, D. A., FRASCH, C. E., HIDALGO, N.T., MILAGRES, L. G., PESSOA, L. L., PESSOA, L. L., RAMOS, S. R., CAMARGO, M. C. C., MELLES, C. E. A. Emergence of a new clone of serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1282-1286, 1992.
- SACCHI, C. T., TONDELLA, M. L. C., LEMOS, A. P. S., GORLA, M. C. O., BERTO, D. B., KUMIOCHI, N. H., MELLES, C. E. A. Characterization of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup C strains in several Brazilian states. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1783-1787, 1994.
- SACCHI, C. T., TONDELLA, M. L. C., GORLA, M. C. O., LEMOS, A. P. S., MELLES, C. E. A., PAIVA, M. V., RODRIGUES, D. S., ANDRADE, A. J. F., RIBEIRO, M. O., SPERB, A. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* serogroup C epidemic strains south Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.281-289, 1995.
- SACCHI, C. T., LEMOS, A. P. S., WHITNEY, A. M., SOLARI, C. A., BRANDT, M. E., MELLES, C. E. A., FRASCH, C. E., MAYER, L. W. Correlation between serological and sequencing analysis of the PorB outer membrane protein in the *Neisseria meningitidis* serotyping system. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.5, p.348-354, 1998a.
- SACCHI, C. T., LEMOS, A. P. S., BRANDT, M. E., WHITNEY, A. M., MELLES, C. E. A., SOLARI, C. A., FRASCH, C. E., MAYER, L. W. Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable region typing nomenclature. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 5, p.845-855, 1998b.

- SACCHI, C. T., LEMOS, A. P. S., CAMARGO, M. C. C., WHITNEY, A. M., MELLES, C. E. A., SOLARI, C. A., FRASCH, C. E., MAYER, L. W. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 4 in São Paulo, Brazil, 1990 to 1996. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.40, p.65-70, 1998c.
- SACCHI, C. T., WHITNEY, A. M., POPOVIC, T., BEALL, D. S., REEVES, M. W., PLIKAYTIS, B. D., ROSENSTEIN, N. E., PERKINS, B. A., TONDELLA, M. L. C., MAYER, L. W. Diversity and prevalence of PorA types in *Neisseria meningitidis* serogroup B in the United States, 1992-1998. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.1169-1176, 2000
- SACCHI, C. T., WHITNEY, A. M., REEVES, M. W., MAYER, L. W., POPOVIC, T. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.4520-4527, 2002.
- SALIH, M. A. M., DANIELSSON, D., BACKMAN, A., CAUGANT, D., A., ACHTMAN, M. OLCEN, P. Characterization of epidemic and non-epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup A strains from Sudan and Sweden. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.1711-1719, 1990.
- SEIFERT, H.S., AJIOKA, R.S., MARCHAL, C., SPARLING, P.F., SO, M. DNA transformation leads to pili antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. **Nature**, v.336, p.392-395, 1988.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N., WHITTAN, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.51, p.873-884, 1986.
- SCHOLTEN, R. J. P. M., KUIPERS, B., VALKENBURG, H. A., DANKERT, J., ZOLLINGER, W. D., POOLMAN, J. T. Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. **J. Med. Microbiol.**, v.41, p.236-243, 1994.
- SCHWARTZ, B. , MORRE P.S., BROOME, C. V. Global epidemiology of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**,V.2, p.118-24, 1989.
- SKOCZNSKA, A., KONIOR, R., SADOWY, E., PIATKOWSKA-SMIETANSKA, M., LELEK, B., GNIADKOWSKI, M. Identification of *Neisseria meningitidis* sequence type 66 in Poland. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, p.848-850, 2004.
- SMITH J. M., SMITH N. H., O'ROURKE, M., SPRATT, B. G. How clonal are bacteria? **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.4384-4388, 1993.
- SPRATT B. G., BOWLER, L. D., ZHANG, Q. Y., ZHOU, J., SMITH, J. M. Role interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. **J. Mol. Evol.**, v.34, P.115-125, 1992.

- STEPHENS, D. S. Uncloacking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. **The Lancet**, v. 353, p. 941-942, 1999.
- SUKER, J., FEAVERS, I. M., ACHTMAN M., MORELLI, G., WANG, J. F., MAIDEN, M. C. J. The *porA* gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. **Mol. Microbiol.**, v.12, p.253-265, 1994.
- SUKER, J., FEAVERS, I. M., MAIDEN, M. C. J. Monoclonal antibody recognition of members of the meningococcal P1.10 variable region family: implications for serological typing and vaccine design. **Microbiol.**, v.142, p.63-69, 1996.
- SAWAYA, R., ARHIN, F. F., MOREAU, F., COULTON, J. W., MILLS, E. L. Mutational analysis of the promoter region of the *porA* gene of *Neisseria meningitidis*. **Gene.**, v.233, p.49-57, 1999.
- SWAMINATHAN, B., MATAR, G. M., REEVES, M. W., GRAVES, L. M., AJELLO, G., BIBB, W. F., HELSEL, L. O., MORALES, M., DRONAVALLI, H., EL-SWIFY, M., DeWITT, W., HUNTER, S. B. Molecular subtyping of *Neisseria meningitidis* serogroup B: Comparison of five methods. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.1468-1473, 1996.
- SWARTLEY, J. S., MARFIN, A. A., EDUPUGANTI, S., LIU, L., CIESLAK, P., PERKINS, B., WENGER J. D., STEPHENS D. S. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.271-276, 1997.
- TAHA, M. K. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin Microbiol.**, v.38, p.855-857, 2000.
- TAHA, M. K. Molecular detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v.2, p.89-96, 2002.
- TAHA, M. K., GIORGINI, D., GALAND, M. D., ALONSO, J. M. Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.4158-4163, 2004.
- TETTELIN, H., SAUNDERS, N.J., HEIDELBERG, J., JEFFRIES, A.C., NELSON, K.E., EISEN, J.A., KETCHUM, K.A., HOOD, D.W., PEDEN, J.F., DODSON, R.J., NELSON, W.C., GWINN, M.L., DEBOY, R. PETERSON, J.D., HICKEY, E.K., HAFT, D.H., SALZBERG, S.L., WHITE, O., FLEISCHMANN, R.D., DOUGHERTY, B.A., MASON, T., CIECKO, A., PARKSEY, D.S., BLAIR, E., CITTONE, H., CLARK, E.B., COTTON, M.D., UTTERBACK, T.R., KHOURY, H., QIN, H., VAMATHEVAN, J., GILL, J., SCARLATO, V., MASIGNANI, V., PIZZA, M., GRANDI, G., SUN, L., SMITH, H.O., FRASER, C.M., MOXON, E.R., RAPPUOLI, R., VENTER, J.C. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, v.287, p.1809-1815, 2000.

- TIKHOMIROV, E., SANTAMARIA, M., ESTEVES, K. Meningococcal disease: public health burden and control. **Rapp. Trimest. Statist. Sanit. Mond.**, v.50, p.170-177, 1997.
- TOMASSEN, J., VERMEIJ, P., STRUYVÉ, M., BENZ, R., POOLMAN, J. T. Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants in class 1 (PorA) and class 3 (PorB) outer membrane proteins. **Infect. Immun.**, v.58, p.1355-1359, 1990.
- TSAI, C. M., FRASCH, C. E., MOCCA, L. F. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. **J. Bacteriol.**, v.146, p.69-78, 1981.
- 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.
- TSANG, R. S. W., TSAI, C. M., ZHU, P., RINGUETTE, L. LORANGE, M., LAW, D. K. S. Phenotypic and genetic characterization of a unique variant of serogroup C ET-15 meningococci (with the antigenic formula C:2a:P1.7,1) causing invasive meningococcal disease in Quebec, Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.1460-1465, 2004.
- TZANAKAKI, G., URWIN, R., MUSILEK, M., KRIZ, P., KREMASTINO, J., PANGALIS, A., BLACKWELL, C. C., MAIDEN, M. C. J. Phenotype and genotype approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.1235-1240, 2001.
- TZENG, Y & STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbiol. Infect.**, v.2, p. 687-700, 2000.
- URWIN, R. Sequencing of antigen Genes of *Neisseria meningitidis*. In: Pollard, A. J. & MAIDEN, M. C. J. (eds). **Methods and Protocols**, Humana Press. Totowa, New Jersey, p. 157-172, 2001.
- VAN DER ENDE, A., HOPMAN, C. T. P., ZAAT, S., ESSINK, B. D. O., BERKHOUT, B., DANKERT, J. Variable expression of classe 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. **J. Bacteriol.**, v.177, p.2475-2480, 1995
- VAN DER ENDE, A., HOPMAN, C. T. P., DANKERT, J. Deletion of PorA recombination between clusters of repetitive extragenic palindromic sequences in *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v.67, p.2928-2934, 1999.
- VAN DER ENDE, A., HOPMAN, C. T. P., DANKERT, J. Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v.68, p.6685-6690, 2000

- VAN DER ENDE, A., HOPMAN, C. T. P., KEIJZERS, W. C. M., SPANJAARD, L., LODDER, E. B., VAN KEULEN, P. H., J. DANKERT, J. Outbreak of meningococcal disease caused by Por-A deficient meningococci. **J. Infect. Dis.**, v.187, p.869-871, 2003
- VAN DER LEY, P., HECKELS, J. E., VIRJI, M., HOOGERHOUT, P., POOLMAN, J. T. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. **Infect. Immun.**, v.61, p.4217-4224, 1991.
- VEDROS, N.A. Genus 1 - *Neisseria*. In: KRIEG, N. R., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins Co., v.1, p.290-296, 1984.
- VERDU, M. E., COLL, P., FONTANALS, D., MARCH, F., PONS, F., SANFELIU, I., PRATS, G. Endemic meningococcal disease in Cerdanyola, Spain, 1987-93: molecular epidemiology of the isolates of *Neisseria meningitidis*. **Clin. Microbiol. Infect.** v.2, p.168-178, 1996.
- VIRJI, M., MAKEPEACE, K., FERGUSON, D. J. P., ACHTMAN, M., SARKARI, J., MOXON, E. R. Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.2785-2795, 1992.
- VOGEL, U., MORELLI, G., ZURTH, K., CLAUS, H., KRIENER, E., ACHTMAN, M., FROSCH, M. Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.2465-2470, 1998.
- WANG, J-F., CAUGANT, D. E., LI, X., HU, X., POOLMAN, J. T., CROWE, B., ACHTMAN, M. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the people's Republic of China. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, p.5267-5282, 1992.
- WANG, J., CAUGANT, D. A., MORELLI, G., KOUMARE, B., ACHTMAN, M. Antigenic and epidemiological properties of the ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.** v.167, p.1320-1329, 1993
- WARD, M. J., LAMBDEN, P. R., HECKELS, J. E. Sequence analysis and relationships between meningococcal class 3 serotype protein and other porins from pathogenic and nonpathogenic *Neisseria* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.94, p.283-290, 1992.
- WEDEGE, E. & FROHOLM, L.O. Human antibody response to a group serotype 2a meningococcal vaccine determined by immunoblotting. **Infect. Immun.**, v.51, p.571-578, 1986.
- WEDEGE, E., HOIBY, E. A., ROSENQVIST, E., FROHOLM, L. O. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. **J. Med. Microbiol.**, v.31, p.195-201, 1990.

- WHALEN, C. M., HOCKIN, J. C., RYAN, A., ASHTON, F. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. **JAMA**, v.273, p.390-394, 1995.
- WOODS, J. P. & CANNON, J. G. Variation in expression of class 1 and 5 outer membrane proteins during nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v.58, p.569-572, 1990.
- WOODS, J. P., KERSULYTE, D., TOLAN, R. W., BERG, C. M., BERG, D. E. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis to type disease and carrier strains of *Neisseria meningitidis* isolated during a university outbreak. **J. Clin. Microbiol.**, v.169, p.1384-1389, 1994.
- WOODS, C. R., KOEUTH, T., ESTABROOK, M. M., LUPSKI, J. R. Rapid determination of outbreak-related strains of *Neisseria meningitidis* by repetitive element-based polymerase chain reaction genotyping. **J. Infect. Dis.**, v.174, p.760-767, 1996.
- YAKUBU, D. E. & PENNINGTON, T. H. Epidemiological evaluation of *Neisseria meningitidis* serogroup B by pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v.10, p.185-190, 1995.
- YAKUBU, D. E., ABADI, F. J. R., PENNINGTON, T. H. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. **J. Med. Microbiol.**, v.48, p.1055-1064, 1999.
- YAZDANKHAH S. P., KRIZ, P., TZANAKAKI, G., KREMASTINO, J., KALMUSOVA, J., MISILEK, M., ALVESTAD, T., JOLLEY, K. A., WILSON, D. J., McCARTHY, N. D., CAUGANT, D. A., MAIDEN, M. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carries isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.5146-5153, 2004.
- ZAPATA, G. A., VANN, W. F., RUBINSTEIN, Y., FRASCH, C. E. Identification of variable regions differences in *Neisseria meningitidis* class 3 protein sequences among five groups B serotypes. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.3493-3499, 1992.
- ZOLLINGER, W. D. & MANDRELL, R. E. Outer membrane protein and lipopolisaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid phase radioimmunoassay. **Infect. Immun.**, v.18, p.424-433, 1977.
- ZOLLINGER, W. D., MANDRELL, R. E., GRIFFISS, 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.
- ZOLLINGER, W. D., MORAN, E. E., CONNELLY, H., MANDRELL, R. E., BRANDT. Monoclonal antibodies to serotype 2 and serotype 15 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and their use in serotyping. **Infect. Immun.**, v.46, p.260-266, 1984.

ZOLLINGER, W. D. New and improvement against meningococcal disease. In: WOODROW, G. C., LEVINE, M. M., eds. **New Generation Vaccines**. New York: Marcel Dekker, p.325-347. 1990.

ZHU P., VAN DER ENDE, A., FALUSH., D., BRIESKE., N., MORELLI, G., LINZ, B., POPOVIC, T., SCHUURMAN, I. G. A., ADEGBOLA, R. A., ZUURTH, K., GAGNEUX, S., PLATONOV., A. E., RIOU, J. Y., CAUGANT, D. A., NICOLAS, P., ACHTMAN, M. Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.98, p.5234-5239, 2001.



## **10. ANEXOS**

**ANEXO 1**

LOCUS AY737715 1259 bp DNA linear BCT 27-SEP-2004  
 DEFINITION *Neisseria meningitidis* PorA (porA) gene, complete cds.  
 ACCESSION AY737715  
 VERSION AY737715

## KEYWORDS

SOURCE *Neisseria meningitidis*  
 ORGANISM *Neisseria meningitidis*  
 Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales;  
 Neisseriaceae; *Neisseria*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1259)

AUTHORS Lemos,A.P.S. and Yara,T.I.

TITLE *Neisseria meningitidis* PorA variable-region typing nomenclature

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1259)

AUTHORS Lemos,A.P.S. and Yara,T.I.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (30-AUG-2004) *Bacteriology*, Adolfo Lutz, Av Dr Arnaldo,  
 Sao Paulo, SP 01246902, Brazil

## FEATURES

Location/Qualifiers  
 source 1..1259  
 /organism="*Neisseria meningitidis*"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="N.753/00"  
 /serotype="NST:NSST"  
 /db\_xref="taxon:487"  
 /note="serogroup: C"  
 gene 33..1205  
 /gene="porA"  
 RBS 33..37  
 /gene="porA"  
 CDS 45..1205  
 /gene="porA"  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /product="PorA"  
 /protein\_id="AAU85848"  
 /translation="MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNIQLQLTEQP  
 SKAQGGQTNNOVKVTKAKSRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGEGLKAVWQLEQDVSVAGG  
 GATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQLGIFKRHDD  
 MPVSVRYDSPDFSGFSGSVQFVPAQNSKSAITPAYVDEKQVSHAADVVKPGSDVYAG  
 LNYKNGGFAGSYAFKYAKHANEGRDAFFLFLGSGSDEAKGTDPLKNHQVHRLTGGYE  
 EGGLELALAAQLDLSENADKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKG  
 ENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTIINAASVGLRHKF"

## ORIGIN

```

1 ccgatgtttt taggttttta tcaaatttac aaaaggaagc cgatatgcca aaaaaactta
61 ccgccctcgt attgtccgca ctgccgcttg cggcccttgc cgatgtcagc ctgtaccggc
121 aatcaaaagc cggcgtggaa ggcaggaaca tccagctgca attgaccgag cagccctcaa
181 aggctcaagg tcaaacgaac aatcaggtaa aagttactaa ggcaaaaagc cgcacagga
241 cgaatcagcg cgatttcggc tcgtttatcg gctttaaggg gagcagagat ttgggcgaa
301 ggctgaaggc tgtttggcag cttgagcaag acgtatccgt tgccggcggc ggcgcgacc
361 agtggggcaa caggaatcc tttatcggct tggcagcga attcgttacg ctgcgcgccg
421 gtcgcgttgc gaatcagttt gacgatgcca gccaagccat tgatccttgg gacagcaata
481 atgatgtggc ttcgcaattg ggtattttca aacgccacga cgatatgccg gtttccgtac
541 gctacgactc tccggacttt tccggtttca gcggcagcgt ccaattcgtt ccggctcaaa
601 acagcaagtc cgcctatacg ccggcttatg tggatgagaa gcaggtgtct catgcccgtg
661 ttgtcggcaa gcccggtcgc gatgtgtatt atgcccgtct gaattacaaa aatggcggat
721 ttgccgggag ctatgccttt aaatatgcga aacacgcca tgaggggctg gatgctttct
781 ttttgttctt gctcggcagc gggagtgatg aagccaaagg taccgatccc ttgaaaaacc
841 atcaggtaca ccgctgacg ggcggctatg aggaaggcgg cttgaatctc gccttggcgg
901 ctcagtttga tttgtctgaa aatgccgaca aaacaaaaaa cagtacgacc gaattgccc
961 ccaactgctc ctaccgcttc ggtaatgcag ttccgcgcat cagctatgcc catggtttcg
1021 actttatcga acgcggtaaa aaaggcgaat ataccagcta cgatcaaatc atcgcggcgg
1081 ttgattatga tttttccaaa cgcacttccg ccatcgtgtc tggcgttttg ctgaaacgca
1141 ataccggcat cggcaactac actcaaatca atgccgcctc cgtcggtttg cgccacaat
1201 tctaaatcgc gggcgggtga agcggatagc tttgtttttg acgcttggcc ttcattctt

```

## ANEXO 2

LOCUS AY972814 951 bp DNA linear BCT 16-APR-2005  
 DEFINITION *Neisseria meningitidis* strain N.753-00 class 2 porin protein (porB) gene, partial cds.  
 ACCESSION AY972814  
 VERSION AY972814.1 GI:62466176  
 KEYWORDS .  
 SOURCE *Neisseria meningitidis*  
 ORGANISM *Neisseria meningitidis*  
 Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales;  
 Neisseriaceae; *Neisseria*.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 951)  
 AUTHORS Lemos,A.P. and Yara,T.I.  
 TITLE *Neisseria meningitidis* PorB variable-region typing nomenclature  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 951)  
 AUTHORS Lemos,A.P. and Yara,T.I.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (23-MAR-2005) *Bacteriology*, Adolfo Lutz, Av Dr Arnaldo, Sao Paulo, SP 01246-902, Brazil  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..951  
 /organism="Neisseria meningitidis"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="N.753-00"  
 /serotype="NT"  
 /db\_xref="taxon:487"  
 /note="type: PorB VR type D,Ed,D,Db; subtype: NST; serogroup: C"  
 gene <1..>951  
 /gene="porB"  
 cds <1..>951  
 /gene="porB"  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /product="class 2 porin protein"  
 /protein\_id="AAX83414.1"  
 /db\_xref="GI:62466177"  
 /translation="EVSrvkNqGvKtKtATQIADFGSKIGFKGQEDLNGMKAIWQLE QKASIAGTNSGWNRSFIFGLKGGFGTVRVGNLNTVLKDSGDVNAWESGSNTGDVVG LGTIGRVESREISVRYDSPVFAGFSGSVQYVPRDNANDKDKYTHKQSSRESYHAGLKY ENAGFFGQYAGSFAKYADLKDNAERVAVGTTGAHPVKDYQVHRVVAGYDANDLYVSVAGQYEAANKNDTNPATNGKLEQTQVAATAAYRFGNVTPRVSYAHGFKAKVNGKKAARY QYDQVIVGADYDFSKRSTALVSVGWLKEGKGVNKTEKTASM"  
 ORIGIN  
 1 gaagtttctc gcgtaaaaaa tcaaggcgta aaaacaaaaa ctgcaacca aattgccgac  
 61 ttcggttcta aaatcggttt caaagggtcaa gaagacctcg gcaacggcat gaaagccatt  
 121 tggcagttgg aacaaaaaagc ctccatcgcc ggcactaaca gcggtctggg taaccgccag  
 181 tcttcacatg gcttgaaagg cggcttcggt accgtccgag tcggtaatct gaacaccgta  
 241 ttgaaagaca gcggcgacaa cgtcaatgca tgggaatctg gttctaaccac cggagatgta  
 301 ctgggactgg gtactatcgg tcgtgtagaa agccgtgaaa tctccgtacg ctaccgactct  
 361 ccogtatttg caggcttcag cggcagcgta caatacgttc cgccgcgacaa tgccgaatgat  
 421 aaggacaaat acacacataa gcagtcacagc cgtgagtctt accacgcccg tctgaaatac  
 481 gaaaatgccg gtttcttcgg tcaatacgca ggctcttttg ccaaataatgc tgatttgaaa  
 541 gataatgcag agcgtgttgc agtaggtact acaggtgccc atcctgttaa agattaccaa  
 601 gtacaccogc tagttgccgg ttacgatgcc aatgacctgt acgtttctgt tgccggctcag  
 661 tatgaagctg ctaaaaacaa cgataactaat cctgccaacta atggtaaaaa actcgagcaa  
 721 actcaagttg ccgctactgc cgcttaccgt ttgggcaacg taaccgctcg cgtttcttac  
 781 gctcacgctt tcaaagctaa agtgaatggc aagaaagcag cacgttatca ataccgacaa  
 841 gttatcgttg gtgccgacta cgacttctcc aaacgcactt ccgctctggt ttctgtcggg  
 901 tggttgaaag aaggcaaaag cgtaaacaaa actgaaaaaa ctgccagcat g

**ANEXO 3. Relação das cepas de *Neisseria meningitidis* cujos os genes *porB* foram sequenciados e submetidos ao GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))**

<b>Cepa</b>	<b>N. de acesso ao GenBank</b>
N.268/97	DQ067099
N.840/93	DQ067100
N.1243/95	DQ067101
N.260/92	DQ071622
N.1097/90	DQ067102
N.3/94	AY995861
N.884/94	AY995879
N.892/96	AY995870
N.470/97	DQ071627
N.590/97	AY995882
N.971/97	DQ071628
N.541/98	AY995866
N.879/98	DQ071625
N.910/98	DQ067103
N.343/99	DQ0711626
N.657/99	AY995863
N.684/99	AY995869
N.282/00	DQ071621
N.111/00	AY995868
N.174/00	AY995867
N.186/00	DQ071629
N.667/00	DQ067104
N.668/00	DQ067105
N.837/00	AY973235
N.1072/01	AY995862
N.356/01	AY995877
N.501/01	DQ071624
N.617/01	DQ071630
N.820/01	DQ071623
N.958/01	AY995864
N.1005/01	AY995880
N.1020/01	DQ071631
N.1037/01	AY995881
N.607/02	DQ067106
N.660/02	AY995860
N.94/02	DQ067107
N.297/02	AY995874
N.534/02	AY995876
N.563/02	AY995859
N.910/02	AY995871
N.929/02	DQ067108
N.996/02	DQ067109
N.1013/02	AY995865
N.687/03	DQ067110
N.04/03	AY995878
N.140/03	AY995872
N.176/03	DQ067111
N.197/03	DQ067112
N.274/03	AY995873
N.277/03	AY995875