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

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE CEPAS DE *Neisseria meningitidis*
SOROGRUPO B: SOROTIPO 4
ISOLADAS NO BRASIL

Ana Paula Silva de Lemos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Dr. Carmo Elias Andrade Melles

São Paulo
2000

ANA PAULA SILVA DE LEMOS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE CEPAS DE *Neisseria meningitidis*
SOROGRUPO B: SOROTIPO 4
ISOLADAS NO BRASIL**

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Dr. Carmo Elias Andrade Melles
Orientador/Presidente

Dr^a. Mirthes Ueda
1º Examinador

Prof. Dr. Waldemar Francisco
2º Examinador

São Paulo, 24 de Novembro de 2000

de acordo

Dr. Carmo Elias Andrade Mello
RG. 2695444
Coordenador do Centro de Referência
Nacional de Meningites

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Bactérias
Piogênicas e Toxigênicas na Seção de Bacteriologia do Instituto
Adolfo Lutz Central e no “Meningitis and Special Pathogens
Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National
Centers of Infectious Diseases, Centers for Disease Control and
Prevention”, CDC, Atlanta, GA, USA.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Agente Etiológico	2
1.2 Estrutura Antigênica de <i>N. meningitidis</i>	3
1.2.1 Cápsula	3
1.2.2 Membrana externa	6
1.2.2.1 Proteína	6
1.2.2.2 Lipopolissacáride	8
1.2.3 Pili	9
1.3 Caracterização de <i>N. meningitidis</i>	9
1.3.1 Caracterização Fenotípica	9
1.3.1.1 Sorogrupagem	9
1.3.1.2 Sorotipagem	9
1.3.2 Caracterização Genotípica	13
1.3.2.1 Tipagem de Regiões Variáveis	13
1.4 Marcadores Epidemiológicos	18
1.4.1 Ribotipagem	19
1.5 Epidemiologia de <i>N. meningitidis</i>	20
2. OBJETIVOS	22

3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Cepas de <i>Neisseria meningitidis</i>	25
3.2 Sorotipagem	26
3.3 Determinação dos padrões de restrição do gene <i>rRNA</i>	27
3.3.1 Extração e purificação do DNA cromossômico	27
3.3.1.1 Lise da suspensão bacteriana	28
3.3.1.2 Tratamento com a mistura clorofórmio + fenol + álcool isoamílico	28
3.3.1.3 Tratamento com RNase	28
3.3.1.4 Tratamento com proteinase K	29
3.3.1.5 Segundo tratamento com a mistura CFA	29
3.3.1.6 Precipitação do DNA	29
3.3.2 Verificação da qualidade das amostras de DNA	29
3.3.3 Escolha das enzimas de restrição para clivagem das amostras de DNA	30
3.3.3.1 Digestão das amostras de DNA pelas enzimas de restrição	30
3.3.3.2 Eletroforese dos fragmentos clivados	31
3.3.3.3 Transferência a vácuo dos fragmentos clivados por Southern blotting	32
3.3.3.4 Fixação dos fragmentos clivados de DNA	32
3.3.4 Preparo da sonda : plasmídeo pKK3535	33
3.3.4.1 Extração e purificação do plasmídeo pKK3535	33
3.3.4.2 Determinação da concentração	33
3.3.4.3 Digestão da sonda pKK3535 pela enzima de restrição <i>EcoRI</i>	34
3.3.4.4 Marcação e quantificação do plasmídeo pKK3535 com digoxigenina	34
3.3.5 Pré - hibridização e hibridização das membranas	35
3.3.6 Detecção colorimétrica	35
3.3.7 Determinação dos pesos moleculares dos fragmentos de DNA	36
3.3.8 Distância filogenética	36

3.4 Análise dos genes <i>porA</i> e <i>porB</i>	37
3.4.1 Amplificação dos genes <i>porA</i> e <i>porB</i>	37
3.4.2 Sequenciamento dos genes <i>porA</i> e <i>porB</i>	38
3.4.3 Números de acesso no <i>GenBank</i>	39
3.5 Meios de cultura e soluções	44
4. RESULTADOS	57
4.1 Distribuição dos epítomos de sorotipo 4, 7 e 10 em 630 cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo B isoladas no Brasil durante 1997	58
4.2 Frequência da distribuição dos sorosubtipos de <i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo B, segundo os sorotipos 4; 4,1; 4,7; 4,10; 4,21; 7 e 10 isolados no Brasil durante 1997	60
4.3 Diversidade genética entre as 105 cepas de <i>Neisseria</i>	62
4.4 Sequenciamento do gene <i>porB</i>	69
4.5 Sequenciamento do gene <i>porA</i>	73
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES	82
7. RESUMO	84
8. ABSTRACT	86
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
10. ANEXOS	105

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
CFA	Clorofórmio + fenol + álcool isoamílico
bp	“Base pairs”
DM	Doença Meningocócica
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
dNTP	“2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphate”
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
ET	“Electrophoretic Type”
IgG	Imunoglobulina G
KDa	KiloDalton
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-octanato
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LOS	Lipooligossacáride
LPS	Lipopolissacáride
M	Molar
mAb	anticorpo monoclonal
MEE	“Multilocus Enzyme Electrophoresis”
mg	miligrama
mL	mililitro
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
mM	Milimolar
N	Normal

ng	nanograma
nm	nanômetro
NT	não sorotipável
nt	não sorosubtipável
OMP	“Outer Membrane Protein”
Opa	“Opacity associated protein”
Opc	“Outer membrane protein class 5 precursor”
PAGE	“Polyacrylamide gel electrophoresis”
PBS	“Phosphate buffered saline”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis”
Rb	Ribotipo
Rmp	“Reduction modifiable protein”
rpm	rotação por minuto
SDS	“Sodium dodecyl sulphate”
SPRIA	“solid-phase radioimmunoassay”
SSC	Solução salina com citrato
SVR	“Semi Variable Region”
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	“N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine”
TSA	“Tryptic Soy Agar”
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade
VR	“Variable Region”

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 MODELO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS DE CLASSE 1 (PorA). A PARTE SUPERIOR DE CADA MODELO MOSTRA A REGIÃO EXPOSTA E A PARTE CENTRAL, O SEGMENTO TRANSMEMBRANA (VAN DER LEY ET AL., 1991). 16

FIGURA 2 MODELO ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS DE CLASSE 2 (PorB). A PARTE SUPERIOR DE CADA MODELO MOSTRA A REGIÃO EXPOSTA E A PARTE CENTRAL, O SEGMENTO TRANSMEMBRANA (VAN DER LEY ET AL., 1991). 17

FIGURA 3 DIAGRAMA ILUSTRANDO O POSICIONAMENTO DOS INICIADORES DE SEQUENCIAMENTO, EM RELAÇÃO AO GENE *porA*. 41

FIGURA 4 DIAGRAMA ILUSTRANDO O POSICIONAMENTO DOS INICIADORES DE SEQUENCIAMENTO, EM RELAÇÃO AO GENE *porB* 43

FIGURA 5 PADRÕES DE RESTRIÇÃO DE QUATRO CEPAS DE *Neisseria meningitidis* OBTIDOS COM A ENDONUCLEASE *ClaI*. 67

FIGURA 6 SIMILARIDADE DE BANDAS ENTRE OS RIBOTIPOS DAS CEPAS DO GÊNERO NEISSERIA, EM PERCENTUAL. 68

FIGURA 7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PRODUTO AMPLIFICADO, GENE *porB*, PELA PCR. 70

FIGURA 8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PRODUTO AMPLIFICADO, GENE *porA*, PELA PCR. 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 ESTRUTURA QUÍMICA DOS ANTÍGENOS CAPSULARES DIFERENCIADORES DOS SOROGRUPOS DE <i>Neisseria meningitidis</i>	5
TABELA 2 REALAÇÃO DOS SOROTIPOS E SOROSUBTIPOS DE <i>N. meningitidis</i>	12
TABELA 3 SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>porA</i> .	40
TABELA 4 SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>porB</i>	42
TABELA 5 DISTRIBUIÇÃO EM NÚMERO E PERCENTUAL DOS SOROTIPOS 4, 7 E 10 EM 630 CEPAS DE <i>Neisseria meningitidis</i> SOROGRUPO B ISOLADAS NO BRASIL DURANTE 1997	59
TABELA 6 FREQUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DOS SOROSUBTIPOS DE <i>Neisseria meningitidis</i> SOROGRUPO B, SEGUNDO OS SOROTIPOS 4; 4,1; 4,7; 4,10; 4,21; 7 E 10 ISOLADOS NO BRASIL DURANTE 1997	61
TABELA 7 REPRESENTAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS 105 CEPAS DE NEISSERIA ANALISADAS E SUAS RESPECTIVAS ORIGENS	64
TABELA 8 CARACTERIZAÇÃO DAS OITO CEPAS DE <i>Neisseria meningitidis</i> B:4, B:7 E B:10 QUANTO AO SOROGRUPO, SOROTIPO, SOROSUBTIPO, TIPO DE REGIÃO VARIÁVEL E RIBOTIPO ASSOCIADAS AO SEU NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK	71
TABELA 9 TIPOS E SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS NA PROTEÍNA PorB DAS CEPAS <i>Neisseria meningitidis</i> SEQUENCIADAS	72
TABELA 10 CARACTERIZAÇÃO DAS NOVE CEPAS DE <i>Neisseria meningitidis</i> NÃO SOROSUBTIPÁVEIS QUANTO AO SOROGRUPO, SOROTIPO, SOROSUBTIPO, TIPO DE REGIÃO VARIÁVEL E RIBOTIPO	75
TABELA 11 TIPOS E SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DA PROTEÍNA PorA DE NOVE CEPAS DE <i>Neisseria meningitidis</i> NÃO SOROSUBTIPÁVEIS SEQUENCIADAS	76

Aos meus pais,

pela minha formação

Agradecimentos,

Carmo Elias Andrade Melles pela orientação recebida na elaboração desta dissertação.

Claudio Tavares Sacchi pela colaboração científica ao longo destes anos

Leonard W. Mayer pela oportunidade de desenvolver o sequenciamento genético em seu laboratório no Centers for Disease Control and Prevention

Maria Vaneide de Paiva pelo valioso auxílio técnico e disponibilidade sempre em ajudar

À Banca examinadora da Qualificação da dissertação, Dr^a. Mirthes Ueda, Prof^a. Dr^a. Elza Mamizuka e Prof. Dr. Waldemar Francisco pelos comentários, correções e valiosas sugestões

Maria Cristina Brandileone e Vera Simonsen Vieira por permitirem a realização deste trabalho na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz

Aos companheiros Cecília, Ângela, Rose, Lucilaine, Glória, Samanta, Sérgio, Luiza, Tereza e a todos aqueles da Seção de Bacteriologia que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração dessa dissertação

1. INTRODUÇÃO

A doença meningocócica (DM) é conhecida desde 1805, quando Vieussex descreveu uma epidemia de febre cerebroespinal em Genebra - Suíça e continua sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. 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 Weichselbaum e posteriormente denominado *Neisseria meningitidis*, também conhecido como meningococo (DeVOE, 1992).

N. meningitidis pertence à família Neisseriaceae, gênero *Neisseria*, espécie *meningitidis*, se apresenta na forma de cocos (0.6 - 1,0 μ m de diâmetro), geralmente aos pares, com aspecto riniforme e são Gram negativos. Possuem cápsula e fímbrias. Os meningococos não possuem 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. Produzem ácidos a partir de glicose e maltose. A porcentagem de bases guanina e citosina na molécula de DNA é de 50-52 (BJUNE et al., 1991).

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 a 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 peptoglicano e membrana externa. A membrana externa é constituída de lipopolissacáride (LPS) e de uma bi-camada fosfolipídica na qual as proteínas de membrana externa (OMPs) estão inseridas. Cepas patogênicas isoladas de infecções sistêmicas têm a membrana externa circundada por uma cápsula polissacarídica.

1.2.1 Cápsula

A cápsula do meningococo consiste de um polissacáride aniônico de alto peso molecular e sua natureza imunoquímica é a base para classificação dos meningococos em diversos sorogrupos. 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), tabela 1.

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, 1990,

refere a 13 sorogrupos, entretanto, ressalta, que o sorogrupo D não está bem definido quanto a sua composição química e estrutural.

A cápsula protege a bactéria contra a fagocitose, estando também associada à resistência contra a atividade bactericida do soro normal e à virulência em camundongos (CRAVEN et al., 1982; MASSON et al., 1985; JARVIS et al., 1987).

TABELA 1 ESTRUTURA QUÍMICA DOS ANTÍGENOS CAPSULARES DIFERENCIADORES DOS SOROGRUPOS DE *Neisseria meningitidis*

Sorogrupo	Unidade repetitiva do polissacáride	Ligação	Localização O-acetil
A	→ 6)- α -D-ManpNac-(1-PO ₄ →	α -(1→6)	C-3 manosamine
B	→ 8)- α -D-NeupNac-(2→	α -(2→8)	Ausente
C	→ 9)- α -D-NeupNac-(2→	α -(2→9)	C-7 e C-8 do ácido siálico
W135	→ 6)- α - D-Galp-(1→4)- α -D-NeupNac-(2→	α -(2→6)	Ausente
29E	→ 3)- α -D-GalpNac-(1→7)- β -D-KDOP-(2→	α -(2→3)	C-4 e C-5 do KDO
L	→ 3)- N,N',N''-tri-Ac-Glcp-(1-P O ₄ →	α -(1→3)	Ausente
X	→ 4)- α -D-GlcpNac-(1-PO ₄ →	α -(2→4)	ausente
Y	→ 6) - α - D-Glcp-(1→4)- α -D-NeupNac-2→	α -(2→6)	C3, C4 da Glcp e C7 do ácido siálico
Z	→ 3)- α -D-GalpNac-(1→1')-glicerol-(3PO ₄ →	α -(2→3)	ausente
H	→ 4)- α -D-Galp-(1→2)-glicerol-(3-PO ₄ →	α -(3→4)	C2 e C3 da Galp
I	→ 4)- α -L-GluNacA-(1→3)- β -D-ManNacA-(1→	-(1→4)	C4 da ManNacA
K	→ 3)- β -D-ManNacA-(1→4)- β -D-ManNacA-(1→	β -(1→3)	C4 da 1ª ManNacA

1.2.2 Membrana Externa :

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

1.2.2.1 Proteína :

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

A caracterização das proteínas da membrana externa do meningococo de acordo com seu peso molecular, comportamento em SDS-PAGE, susceptibilidade a enzimas proteolíticas e mapeamento peptídico, resultou na diferenciação de cinco classes estruturais: classe 1, 2, 3, 4 e 5, que apresentam pesos moleculares respectivamente de 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 solutos hidrofílicos atravessam a membrana externa, por um processo semelhante à difusão (DORSET et al., 1984; LINCH et al., 1984; MURAKAMI et al., 1989; TOMASSEN et al., 1990). 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).

Proteínas da classe 1 , também denominadas PorA, e da classe 5, denominada 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). Estudos revelam a relação entre essa classe protéica com a patogênese e a aderência do meningococo em tecidos humanos (FRASCH et al., 1985). A proteína Opc, inicialmente denominada 5C, embora apresente algumas propriedades comuns as Opas , se distingue pela pouca homologia. Gene *Opc* não possui a sequência repetida pentamérica CTCTT , que regula a translação do gene *Opa* (VIRJI et al., 1992).

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

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 classssificadas em sorosubtipos, que são determinados por proteínas de classe 1. Eventualmente, pode-se usar as proteínas de classe 5 para classificação 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 Lipooligossacáride

Os glicolípídeos da membrana externa do meningococo contêm oligossacárides curtos de diferentes composições químicas denominados lipooligossacárides (LOS). Os LOS são compostos por 4 regiões (GRIFFISS et al., 1988) :

1. Lípide A ou glicolípide basal, de natureza hidrofóbica, ancorado na membrana externa e é constituído de glicosaminil-beta-(1-6) glicosamina e ácido láurico. Essa é a região responsável pela toxicidade da molécula.
2. *Core* de oligossacáride 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 pentassacáride 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 elongação que compreende um domínio entre o *core* e a sequência 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 oligossacáride.

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 da superfície celular. Estruturas análogas são encontradas em *Neisseria gonorrhoeae*.

O meningococo expressa duas diferentes classes de pili: classe 1 e classe 2, que são antigenicamente e estruturalmente distintas (HECKELS, 1989; GOTSCHLICH et al., 1990).

Essas estruturas estão envolvidas no processo de adesão. A biossíntese da formação do pili e sua translocação através do envelope celular têm sido motivos de estudo para melhor conhecimento desse processo (POOLMAN et al., 1995).

1.3 Caracterização de *N. meningitidis*

1.3.1. Caracterização Fenotípica

1.3.1.1 Sorogrupagem

A sorogrupagem é baseada nas diferenças dos polissacárides capsulares, como apresentado no item 1.2.1. Os sorogrupos são identificados pelas técnicas de soroaglutinação (VEDROS, 1984), coaglutinação ou empregando anticorpos monoclonais (mAbs) em técnicas de *ELISA* ou *dot-blotting assay* (MORELLO et al., 1991).

1.3.1.2 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 em solução salina ou 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 há uso de uma variedade de técnicas empregando anticorpos monoclonais para identificação de sorotipos e sorosubtipos, 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 18 sorotipos e 18 sorosubtipos (SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b) (tabela 2). 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* identificada como B:4:P1.15, significa que ela pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4, sorosubtipo P1.15. As nomenclaturas designadas como NT e nt, significam, respectivamente, que as proteínas de sorotipo e sorosubtipo não puderam ser caracterizadas pelo painel de anticorpos monoclonais disponível (FRASCH et al., 1985). Exemplo: B:NT:P1.15; B:4:nt; B:NT:nt.

Diferentes centros de pesquisa buscam a padronização de novos mAbs para caracterização dos diferentes epitopos da PorA e PorB de *N. meningitidis* e após a certificação, são distribuídos aos diferentes Centros de Referência, a exemplo dos mAbs para os sorotipos 7 e 10 e sorosubtipo P1.22a, produzidos no Instituto Adolfo Lutz Laboratório Central - São Paulo.

Devido a pobre imunogenicidade do polissacáride B, atribuída, principalmente, à sua semelhança antigênica com glicolípides e glicoproteínas presentes em células humanas e à sensibilidade a neuraminidases do organismo humano (GRIFISS et al., 1984; FRASCH, 1989), as proteínas de classe , especialmente as de classe 1 , 2 e 3 são alvos de estudos como candidatos a antígenos vacinais (ZOLLINGER, 1990). Estudos demonstram a alta indução de anticorpos bactericidas pela proteína PorA e a indução de anticorpos opsonizantes pela proteína PorB (ROSENQVIST et al., 1995; MILAGRES et al., 1994; PEETERS et al., 1996; MILAGRES et al., 1998; LEHMANN, et al., 1999)

Anticorpos monoclonais contra epítomos localizados nas proteínas PorB e PorA usados respectivamente na sorotipagem e sorosubtipagem, apresentam atividade bactericida *in vitro* , sendo que animais podem ser protegidos contra infecção quando imunizados passivamente com esses anticorpos monoclonais (SAUKKONEN et al., 1997).

Todavia, não é suficientemente abrangente o atual sistema usado para a identificação dos sorotipos e sorosubtipos, pois muitos isolados falham em reagir com o painel de mAbs disponível, ou seja, permanecem não sorosubtipados ou parcialmente sorosubtipados. O motivo é a falta de anticorpos monoclonais que consigam caracterizar toda a diversidade de epítomos de sorotipo e/ou sorosubtipo de *N. meningitidis* (SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b).

TABELA 2. RELAÇÃO DOS SOROTIPOS E SOROSUBTIPOS DE *N. meningitidis* DESCRITOS (SACCHI, et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b)

Sorotipo	Sorosubtipo
1	P1.1
2a	P1.2
2b	P1.3
2c	P1.4
4	P1.5
5	P1.6
7	P1.7
8	P1.9
9	P1.10
10	P1.12
11	P1.13
14	P1.3a
15	P1.14
16	P1.15
16	P1.16
17	P1.19
19	P1.20
21	P1.22
22	P1.22a

1.3.2 Caracterização Genotípica

1.3.2.1 Tipagem das Regiões Variáveis das Proteínas PorA e PorB

Com os progressos que vêm ocorrendo no campo da biologia molecular, a determinação da sequência de nucleotídeos dos genes *porA*, que codifica a proteína PorA e de *porB* que codifica a proteína PorB, tem elucidado a natureza, estrutura, topologia e reatividade dos epitopos nessas proteínas.

McGUINNESS et al., 1990 compararam seqüências de aminoácidos de três proteínas de classe 1 de diferentes sorosubtipos e demonstraram região com um alto grau de homologia estrutural e duas regiões de alta variabilidade, as 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., 1992 em um estudo comparando 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 apresentam oito alças, identificadas de I a VIII, expostas em cada uma dessas porinas. (MAIDEN et al., 1991; FEAVERS et al., 1992; van der Ley et al., 1991). A maior variabilidade em seqüência de aminoácidos entre as proteínas PorA, as chamadas VR1 e VR2, se localizam nas alças I e IV, respectivamente. Duas regiões adicionais que apresentam limitada variabilidade estão localizadas nas alças V e VI; essas regiões são referidas como regiões semi-variáveis 1 e 2, SRV1 e SVR2 (SACCHI et al., 1998b). As proteínas PorB

que apresentam quatro regiões com alto grau de variabilidade na sequência de aminoácidos, VR1, VR2, VR3, VR4, estão localizadas nas alças I, V, VI, VII, respectivamente (BUTCHER et al., 1991; FEAVERS et al., 1992; WARD et al., 1992; ZAPATA et al., 1992; BASH et al., 1995), Figuras 1 e 2 .

Essas conclusões corroboram a idéia de que as VRs são responsáveis por epítomos de sorotipo e sorosubtipo; ou seja, a PorA possui dois epítomos independentes específicos para sorosubtipo 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 sequenciamento das regiões variáveis de PorB e PorA apresenta vantagens em relação a sorotipagem principalmente por determinar quatro epítomos indicadores de sorotipo e dois de sorosubtipo, o que permite a caracterização completa da cepa em estudo (SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b).

O sequenciamento das VRs também demonstra que uma única variação de aminoácido pode abolir a reatividade com alguns mAbs, resultando em cepas não sorotipável e/ou não sorosubtipável (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). Se implantado, certamente, esse esquema será uma ferramenta para estudos epidemiológicos e na prevenção da DM.

Nesse esquema de tipagem, as cepas são grupadas em *famílias de VRs* baseadas em diferenças nas seqüências de aminoácidos das VRs. As seqüências para as quais existem mAbs disponíveis são definidas como protótipas; seqüências que apresentarem $\geq 80\%$ de similaridade em aminoácidos com relação a protótipa pertencem à mesma família de VR. Essas seqüências são definidas como variantes e identificadas com uma letra minúscula como um sufixo após o número que identifica o sorotipo e/ou

sorosubtipo. Assim, por exemplo, P1.10a, P1.10b, P1.10c, P1.10d...P1.10g pertencem à mesma família P1.10 como variantes. (FEAVERS et al., 1996; SUKER et al., 1996, SACCHI et al, 1998a; SACCHI et al., 1998b).

No presente estudo utilizamos esquema de Sacchi et al., 1998, para designação das VRs na PorA e PorB. O referido esquema utiliza letras minúsculas como sufixo para designação de variantes da família, como citado acima, e utiliza letras maiúsculas para designar VRs , para as quais não existem mAbs disponíveis. Assim uma cepa identificada como B:4,D,7,14a:P1.7,1; significa que possui o epítipo de sorotipo 4 na VR1; epítipo D na VR2, epítipo 7 na VR3 e epítipo 14a na VR4, na proteína PorB; epítipo de sorosubtipo P1.7 na VR1 e P1.1 na VR2 na proteína PorA. Nas VR2 da proteína PorB, para qual não existe mAb disponível, o epítipo é caracterizado com a letra D.

FIGURA 1. 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).

1.4 Marcadores Epidemiológicos

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

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 microrganismos (MASLOW et al., 1993; MASLOW & MULLIGAN, 1996)

Vários esquemas de tipagem fenotípica e genética são descritos para *N. meningitidis* e a escolha dos marcadores dependerá das questões epidemiológicas a serem respondidas. Esses marcadores são importantes para a análise da situação epidemiológica dos casos obtidos durante períodos endêmicos e epidêmicos. Entretanto a classificação fenotípica das cepas bacterianas em sorogrupo, sorotipo e sorosubtipo, isoladamente, não refletem necessariamente uma relação genética verdadeira. Dessa forma na vigência de uma epidemia é essencial a utilização de marcadores que definam características genotípicas, por meio de técnicas, como: eletroforese de isoenzimas [*Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MEE)], ribotipagem, eletroforese de campo pulsátil (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (CAUGANT et al., 1987; NI et al., 1992; HART & ROGERS, 1993; ACHTMAN, 1995; YAKUBU et al., 1995; LIND et al., 1998; MAIDEN et al, 1998; ENRIGHT & SPRATT, 1999; FEAVERS et al, 1999; YAKUBU et al., 1999).

1.4.1 Ribotipagem

A ribotipagem ou tipagem do gene *rRNA* é uma ferramenta muito útil em estudos epidemiológicos (BINGEN et al., 1994).

As pesquisas que demonstraram a importância do ácido ribonucléico ribossômico (*rRNA*) como molécula altamente conservada durante o processo evolutivo dos procariotos, constituíram a base do desenvolvimento de uma sonda universal, preparada com as frações 16S + 23S do *rRNA*. Essa sonda nucléica, utilizada pela primeira vez por GRIMONT & GRIMONT em 1986, no estudo de diferentes grupos bacterianos, revelou ser extremamente útil na taxonomia de bactérias Gram negativas e Gram positivas.

A aplicação dessa sonda nucléica está baseada no princípio da conservação dos procariotos. No cromossoma bacteriano estão presentes várias cópias do gene *rRNA*, então a hibridização com o probe de *rDNA* revela somente fragmentos cromossomais que contém a seqüência do *rDNA*.

A aplicação de sonda passou a ser utilizada para fins taxonômicos e estudos epidemiológicos, sendo atualmente uma das técnicas mais precisas (WOODS et al., 1992; SACCHI et al., 1994; TONDELLA et al., 1994; VERDU et al., 1999). SWAMINATHAN et al. em 1996, verificaram que a ribotipagem apresentou 100% de tipabilidade em cepas de *N. meningitidis* quando compararam cinco métodos moleculares

Usando um *probe* não radioativo, a ribotipagem foi mostrada como uma ferramenta útil para estudo de características clonais de um grande número de cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B isoladas durante uma epidemia no Brasil (TONDELLA et al., 1994). Segundo SWAMINATHAN et al., 1996, a ribotipagem apresenta capacidade discriminatória relativamente alta em cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B. SACCHI et al., 1998c,

utilizaram essa metodologia com sucesso, para determinar o clone responsável pelo aumento contínuo da DM na Grande São Paulo.

Em estudos com *Neisseria meningitidis* sorogrupo C , a ribotipagem mostrou-se com uma capacidade de discriminação maior do que o MEE (WOODS et al., 1992). Esta técnica foi usada para caracterizar surtos e epidemias em várias localidades brasileiras (SACCHI et al., 1994; SACCHI et al., 1995).

1.5 Epidemiologia da *N. meningitidis*

Cepas de *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B e C são responsáveis por mais de 90% dos casos de DM, podendo também estar associadas com epidemias (PELTOLA, 1984). O sorogrupo A predomina na África e é responsável por ondas epidêmicas, enquanto os sorogrupos B e C prevalecem em países desenvolvidos e em desenvolvimento, estando associados principalmente a surtos esporádicos (VIRJI, 1996).

A incidência da DM no Brasil tem sido monitorada desde as epidemias pelos sorogrupos A e C que ocorreram em 1971 e 1974 (MORAIS et al., 1974; MACHADO, 1976). De 1980 a 1992 a incidência anual da DM foi de 1.0 a 1.4 por 100.000 habitantes em diferentes estados brasileiros. Durante o período entre 1981 e 1987, cerca de 83% das cepas isoladas pertenciam ao sorogrupo B, enquanto somente 6% pertenciam ao sorogrupo C. Em 1988, a incidência da DM na Grande São Paulo excedeu de 4,06 por 100.000 habitantes , sugerindo uma nova epidemia (SACCHI et al., 1994; SACCHI et al., 1998c). Foi demonstrado que a cepa epidêmica pertence ao complexo ET-5 e apresenta o perfil de ribotipo, Rb1, que tem sido responsável por epidemias na Europa, EUA, Chile e Cuba (CAUGANT et al., 1987; SACCHI et al., 1992, SACCHI et al., 1998c). As cepas de *N. meningitidis* do sorogrupo C, sorotipo 2b sorosubtipo P1.3, C:2b:P1.3, esteve relacionada com epidemias na Grande São Paulo e vários estados brasileiros em 1992 e 1993 (SACCHI et al., 94; SACCHI et al., 1995).

Os sorotipos e sorosubtipos associados com a doença variam entre as regiões geográficas e com o período de tempo (SCHOLTEN et al., 1993). Assim, *N. meningitidis* B:15:P1.7,16; B:15:P1.3; e B:4:P1.15 foram responsáveis respectivamente por epidemias na Noruega, Chile, e Cuba/Brasil (SIERRA et al., 1990; BJUNE et al., 1991; SACCHI et al., 1992; BOSLEGO et al., 1995; SACCHI et al., 1998c).

A sorotipagem das cepas de *N. meningitidis* isoladas no Brasil mostra que dentre o sorogrupo B, o fenótipo 4,7:P1.15 prevalece com cerca de 70% na maioria dos estados; o fenótipo 4,7:P1.7,1 está presente em cerca de 30% nos estados de Pernambuco, Espírito Santo e Sergipe; e nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, o fenótipo 15:P1.7,16 varia de 15 a 40%, dados comunicados pelo Centro de Referência Nacional para Meningites, Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bacteriologia.

No presente estudo, compararemos os resultados obtidos por meio de sorotipagem com o painel de mAbs acrescido dos mAbs para os sorotipos 7 e 10, produzidos pelo Instituto Adolfo Lutz a partir de resultados obtidos pela ribotipagem. O propósito desse estudo será de verificar se a caracterização de múltiplos epítomos na proteína PorB em uma mesma cepa poderia auxiliar na diferenciação de linhagens clonais de cepas *N. meningitidis* B:4.

2.0. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Correlacionar método fenotípico e genotípico na tipagem de cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B: sorotipo:4 isoladas no Brasil em 1997.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar os resultados obtidos por meio de sorotipagem usando o painel de anticorpos monoclonais (mAbs) com os resultados obtidos pela ribotipagem.
- ✓ Determinar as possíveis variações em cepas de *Neisseria meningitidis* sorotipos 4; 7 e 10 por sequenciamento das regiões variáveis do gene *porB*.
- ✓ Sequenciar as duas regiões variáveis do gene *porA* em cepas de *Neisseria meningitidis* não sorosubtipáveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *Neisseria meningitidis*

As cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas no Brasil são enviadas pelos Laboratórios Centrais (LACEN) de cada estado ao Centro de Referência Nacional para Meningites - Instituto Adolfo Lutz - Seção de Bacteriologia para confirmação do sorogrupo, caracterização dos sorotipos e sorosubtipos, e manutenção das cepas de forma liofilizada para posterior estudo epidemiológico.

Durante o ano de 1997 foram recebidas 630 cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, neste estudo, nós analisamos 102 cepas, isoladas de líquido cefalorraquidiano e/ou sangue, pertencentes aos fenótipos B:4 ($n=1$), B:4,1 ($n=1$), B:4,7 ($n=72$), B:4,10 ($n=20$), B:4,21 ($n=1$), B:7 ($n=6$), B:10 ($n=1$).

Dentre as cepas analisadas, foram randomicamente selecionadas aproximadamente 10% entre as cepas B:4,7:P1.7,1 ($n=8$) e B:4,7:P1.15 ($n=45$). Foram analisadas as cepas B:4,7 ($n=17$) de outros sorosubtipos que não acima citados, P1.7,1 e P1.15. Foram incluídas neste estudo 2 cepas epidêmicas de *Neisseria meningitidis* pertencentes ao complexo ET-5 isoladas em 1988 e 1989, N.150/88 e N.44/89 (SACCHI et al., 1994; TONDELLA et al., 1994); e um grupo controle de outras espécies de *Neisseria*: *Neisseria sicca*, *Neisseria cinerea* e *Neisseria polysaccharea* ($n=3$). Essas cepas foram identificadas bioquimicamente na rotina da Seção de Bacteriologia.

Todas as cepas de *Neisseria meningitidis* foram reativadas em ágar chocolate, base Mueller Hinton, para posterior sorotipagem pela técnica *dot-blotting* quando se usou uma suspensão de bactérias íntegras (WEDEGE et al., 1990) e os seguintes anticorpos monoclonais, seguido de suas origens:

Anticorpos para sorotipos 4 (F10-2H7/1F7), 7(F22-8B5/1D10), 10 (F11-6D12/1C5) e sorosubtipos P1.1 (F10-5G6/1B11), P1.4 (F11-2A9/1A4),

P1.15 (F8-8F12/1D6) e P1.22a (F4-1F1/1F3), Ana Paula S. Lemos e Claudio T. Sacchi, Instituto Adolfo Lutz - Brasil; anticorpos para os sorotipos 1 (MN3C6B-95/680), 14 (MN5C8C-95/688) e 21 (6B11-F2-B5-95/692), e sorosubtipos P1.5 (MN22A9.19-95/702), P1.7 (MN14C11.6-95/706), P1.10 (MN20F4.17-95/710), P1.12 (MN20A7.10-95/712), P1.13 (MN25H10.75-95/714) e P1.14 (MN21G3.17-95/716), Dra. Janet Suker, National Institute for Biological Standards and Control - Inglaterra; anticorpos para os sorotipos 2a (2H10-2), 8 (2725H6) e 15 (1951C8), e sorosubtipo P1.2 (1649C7), Dr. Carl E. Frasch, National Institute of Health - EUA; anticorpos para os sorotipos 2c (5-1-p2c) , 5 (7BG5-H2) , 11 (9-1-P11) e 19 (17-1-P119), e sorosubtipo P1.3 (12-1), Dr. Wendell Zollinger, Walter Reed Army Medical Center - EUA; anticorpo para o sorotipo 22 (ATIA5A7/5), Dra. Paula K. Kuzemensza, National Institute for Public Health - República Theca; anticorpos para os sorotipos 6 (MN1-B4C), 9 (MN5C10D) e 16 (93E9.1), e sorosubtipos P1.6 (MN19D6-10) e P1.9 (MN5A10.7), Dr. Jan T. Poolman, University of Amsterdam - Holanda.

3.2 Sorotipagem

Partindo do crescimento em ágar chocolate, base Mueller Hinton, as cepas foram semeadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (uma placa por cepa), contendo ágar soro preparado com base ágar soja e tripticaseína (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, EUA) enriquecido com 1% de soro de cavalo e incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. O crescimento obtido foi coletado e preparou-se uma suspensão bacteriana em tampão PBS/azida (item 3.5.4) e inativada em banho maria a 56°C por 30 minutos. Após inativação, a densidade ótica das suspensões bacterianas foi ajustada para 0.09 a 620 nm e estocada a 4°C.

Foram aplicados 5 µL das suspensões bacterianas referentes às cepas testes e às cepas padrões de sorotipo e sorosubtipo em membrana de nitrocelulose (PROTAN®) com poro de 0.45 µm. Após secagem a

temperatura ambiente, as fitas de nitrocelulose foram colocadas em canaletas plásticas e imersas em 2 mL de solução de bloqueio (item 3.5.5) por 30 minutos com agitação. Os anticorpos monoclonais de sorotipo e sorosubtipo, em suas diluições de uso, foram adicionados separadamente a cada fita. Após 16 horas de incubação com agitação, a temperatura ambiente, seguiram-se quatro lavagens consecutivas com 4 mL de PBS (item 3.5.6) por quatro minutos. Foi adicionado anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (SIGMA® A0278) na diluição a 1/3000 em solução de bloqueio e incubado com agitação por três horas a temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens consecutivas com 4 mL de PBS por quatro minutos e uma lavagem com 4mL de tampão acetato de sódio (item 3.5.7) por quatro 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 3.5.9). A reação foi interrompida com uma lavagem com água destilada.

3.3 Determinação dos padrões de restrição do gene *rRNA*

3.3.1 Extração e purificação do DNA cromossômico

As cepas foram semeadas em tubos de ágar Mueller Hinton chocolate a 5 % e incubados em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade por 24 horas. O crescimento obtido foi semeado, com auxílio de um cotonete, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (duas placas por cepa), contendo ágar soro preparado com base ágar soja e tripticaseína (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, EUA) enriquecido com 1% de soro de cavalo. As placas foram e incubadas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, o crescimento bacteriano foi coletado em tubo de teflon com 10 mL de solução de lise (BRENNER et al., 1982).

3.3.1.1 Lise da suspensão bacteriana

À cada suspensão bacteriana, contida em 10 mL de solução de lise, foram adicionados 216,5 μ L de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 25% e 33 μ L de solução de proteinase K a 20 mg / mL. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a 60°C por uma hora, obtendo-se dessa forma um lisado claro e viscoso.

3.3.1.2 Tratamento com a mistura clorofórmio + fenol + álcool isoamílico (CFA) (SAMBROOK et al., 1982)

Para preparo da mistura CFA, o fenol foi saturado com a solução de lise e separado da fase aquosa por funil de separação. A mistura CFA foi preparada na proporção 25:24:1, para clorofórmio, fenol e álcool isoamílico, respectivamente. Ao lisado foram adicionados 216,5 μ L de SDS a 25% e 10 mL da mistura CFA. Após agitação vigorosa, o material foi centrifugado por 30 minutos a 5.000 rotações por minuto (rpm) e a fase aquosa superior foi decantada e transferida para outro tubo de teflon.

3.3.1.3 Tratamento com RNase

À fase aquosa foram adicionadas 384 μ L de solução de RNase a 2 mg / mL. Após agitação por inversão, os tubos contendo o lisado foram incubados em banho-maria a 60°C por uma hora.

3.3.1.4 Tratamento com proteinase K

Após o resfriamento do lisado, foram adicionados 1.66 μ L de solução de perclorato de sódio 5M, 233 μ L de SDS a 25% e 27,5 μ L de solução de proteinase K 20 mg / mL. Após agitação os tubos foram incubados em banho-maria a 60°C por uma hora.

3.3.1.5 Segundo tratamento com a mistura CFA

Após o tratamento com a proteinase K, foram adicionados 10 mL da mistura CFA. Após agitação vigorosa, o material foi centrifugado por 30 minutos a 5.000 rpm a 4°C e a fase aquosa foi transferida para outro tubo.

3.3.1.6 Precipitação do DNA

À fase aquosa contendo DNA foram adicionados dois volumes de álcool etílico previamente gelado e o DNA foi coletado com o auxílio de um bastão de vidro e dissolvido em 200 μ L de tampão TE. Após dissolução completa as amostras de DNA foram conservadas em tubos com tampa de rosca a -20°C.

A concentração do DNA foi estimada, conforme procedimento proposto por SAMBROOK, et al., 1982. Foi feita a leitura direta da absorbância de cada amostra em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech LKB Ultrospec III, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) a 260 nm e multiplicando-se o valor obtido por 50 μ g/mL. A pureza do DNA foi estimada pela comparação das amostras lidas em 260nm e em 300 nm. Soluções com uma relação 260nm /300nm entre 1,8 e 2,0 foram consideradas puras.

3.3.2 Verificação da integridade das amostras de DNA

Após a determinação da concentração e pureza, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em TAE 1X. Foram homogeneizados 5 µg de DNA de cada amostra com 20 µL de água destilada estéril e 4,0 µL de solução de arraste. Após a solidificação do gel, as amostras foram aplicadas e submetidas a uma eletroforese durante 2-3 horas a 90 volts. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Sigma®) utilizando-se a fonte EPS 200 (Pharmacia Biotech®). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,4 µg / mL por 30 minutos e examinado sobre uma fonte de luz ultravioleta de 254 nm (Pharmacia Biotech®). 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).

3.3.3 Escolha das enzimas de restrição para clivagem das amostras de DNA

A escolha das enzimas de restrição usadas, *Cla*I (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) e *Eco*RV (New England Biolabs®), se baseou em experimentos preliminares (SACCHI et al., 1995), que demonstraram ser as mais apropriadas para digestão de DNA de *Neisseria meningitidis* submetidas à técnica de ribotipagem.

3.3.3.1 Digestão das amostras de DNA pelas enzimas de restrição

Utilizou-se 5 μg de DNA de cada amostra purificado e titulado. A digestão foi realizada em tubos de polipropileno, tipo Eppendorf de 1,0 mL. À cada amostra de DNA foram adicionados 2,0 μL de solução tamponada correspondente para cada enzima e 2 U / μg de DNA da enzima correspondente. O volume foi completado para 20 μL com água ultrapura estéril.

Após uma rápida homogeneização, os tubos foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm em microcentrífuga (Fisher Scientific Company, Springfield, NJ, EUA) por um minuto e, a seguir, foram incubados em banho-maria a 37°C por 16 horas.

A reação enzimática foi interrompida mantendo-se as amostras digeridas em banho-maria a 65°C por 10 minutos. A seguir, as amostras digeridas foram congeladas a -20°C, até momento de submetê-las à eletroforese.

3.3.3.2 Eletroforese dos fragmentos clivados

A separação dos diferentes fragmentos de DNA foi realizada pela eletroforese em gel de agarose a 0.8 % em TAE 1X.

Cada amostra de DNA digerida, após o descongelamento, foi centrifugada a 10.000 rpm em microcentrífuga durante 1 minuto e a seguir, homogeneizada com 4 μL de solução de arraste e aplicada ao gel a 0.8% em TAE 1X previamente preparado. As amostras foram submetidas à eletroforese por 16 horas a 30 volts. A coloração do gel, a visualização do DNA e o registro fotográfico foram realizados como descrito no item 3.3.2.

3.3.3.3 Transferência a vácuo dos fragmentos clivados por Southern blotting (SOUTHERN, 1975).

A membrana de nylon (Boehringer Mannheim GmbH, Biochemicals, Alemanha), de 20 cm x 20 cm, foi previamente umedecida com água ultrapura estéril e , posteriormente, com solução SSC 20X por 20 minutos.

Sobre o suporte do equipamento VacuGene XL Vacuum blotting, System (Pharmacia Biotech®) foram colocados a membrana , o molde de polietileno e o gel. As bolhas de ar existentes foram cuidadosamente retiradas. Fechado o sistema, a bomba de vácuo foi mantida em 50 mbar durante todo o processo.

Foi adicionada sobre o gel a solução de depuração, HCl 0.25 M , sendo mantido com esta solução por sete minutos. Removida a solução de depuração com auxílio de uma pipeta, foi adicionado sobre o gel a solução de denaturação, e mantido com esta solução por sete minutos. Removida a solução de denaturação com auxílio de uma pipeta, foi adicionada sobre o gel a solução neutralizante, e mantido com esta solução por sete minutos. Removida a solução de neutralização com auxílio de uma pipeta, foi adicionada sobre o gel a solução de transferência SSC 20X e mantido imerso nesta solução por 30 minutos. Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC 2X, seca em estufa a 37°C por 40 minutos e posteriormente identificada.

3.3.3.4 Fixação dos fragmentos de DNA

Foi utilizado o equipamento Stratalinker UV Crosslinker modelo 1800 (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). As membranas foram expostas a uma fonte de ultravioleta controlada a 1200 joules.

3.3.4 Preparo da sonda : plasmídio pKK3535

3.3.4.1 Extração e purificação do plasmídio pKK3535

A cepa *Escherichia coli* K12 (ED8654), contendo o plasmídio pKK3535, foi cultivada em 1,0 L de caldo LB (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) contendo ampicilina a 20 µg / mL, por 18 horas com agitação a 30°C. O crescimento bacteriano foi coletado em tubos de teflon, após centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos e ressuspenso em 10 mL de solução contendo 100 µg / mL de RNase (solução 1). Após homogeneização, foram adicionadas 10 mL de solução NaOH 200 mM e SDS 0,1% (solução 2) e, então, incubados a temperatura ambiente por cinco minutos. Foram adicionados 10 mL da solução acetato de sódio 3M (solução 3) e levado imediatamente ao banho de gelo por 20 minutos. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi decantado e purificado utilizando-se o *plasmid - Kit tip 500* (QUIAGEN, Chatsworth, CA, EUA)

3.3.4.2 Determinação da concentração

A leitura direta da absorbância da amostra foi feita em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech LKB Ultrospec III) a 260 e 300.

3.3.4.3 Digestão da sonda pKK3535 pela enzima de restrição *EcoRI*

Para esta etapa foram utilizados 6 µg do plasmídio purificado e titulado. A digestão foi realizada em tubo de polipropileno, tipo Eppendorf de 1,0 mL. À amostra foram adicionados 2,0 µL de solução tamponada correspondente e 2U / µg de DNA da enzima *EcoRI* (New England Biolabs®). O volume foi completado para 20 µL com água ultrapura estéril. Após uma rápida homogeneização, o tubo foi incubado a 37°C por uma hora. Foram adicionados 180 µL de água ultrapura estéril e 200 µL de clorofórmio, para extração do material. Ao volume do material extraído adicionou-se 0.1 volume de acetato de sódio 3M e 2.5 volumes de etanol gelado a 95%. O material foi incubado a -70°C por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos e o precipitado secado a vácuo. O material foi ressuspenso em 6.0 µL de água ultrapura estéril, denaturado por aquecimento por 10 minutos a 95°C e resfriado imediatamente no banho de gelo por 10 minutos.

3.3.4.4 Marcação e quantificação do plasmídio pKK3535 com digoxigenina

O sonda digerida com a enzima de restrição *EcoRI* foi marcada randomicamente com digoxigenina - 11- dUTP , utilizando-se o *Genius Labelling and Detection Kit* (Boehringer Mannheim®). A quantificação foi feita com o mesmo *Kit* acima citado, seguindo-se as instruções do produtor.

3.3.5 Pré - hibridização e hibridização

Utilizou-se o forno de hibridização (WTC-binder, Alemanha).

Para a pré - hibridização, as membranas foram colocadas em tubos de hibridização (uma membrana por tubo) contendo 50 mL de solução de hibridização, durante uma hora a 68°C. Foi descartada a solução de hibridização e adicionados 15 mL de solução de hibridização contendo 2 µg de pkk 3535 marcado com digoxigenina (denaturada a 100°C por 10 minutos e mantida em gelo por 10 minutos). Os tubos foram incubados por 68°C no forno de hibridização durante 16 horas. Após a hibridização, as membranas , mantidas nos tubos de hibridização, foram lavadas com 20 mL da solução SSC 2X/SDS 0.1% a 68°C por duas vezes. Seguiram-se duas lavagens com 20 ml da mesma solução por cinco minutos a 68°C e, posteriormente, duas lavagens com 50 mL da solução SSC 0.1X/SDS a 0.1% por 15 minutos a 68°C.

3.3.6 Detecção por técnica colorimétrica dos fragmentos de DNA hibridizados com a sonda pKK3535

As membranas, mantidas nos tubos de hibridização, foram lavadas com tampão 1 por um minuto, em seguida foram incubadas com 50 mL de tampão 2 a 68°C por 30 minutos e então, foram rapidamente lavadas com tampão 1. Foram adicionados , em cada tubo de hibridização, 12 µL do anticorpo anti - digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim®) em 60 ml de tampão 1 e incubado a temperatura ambiente por 3 horas no forno de hibridização. Seguiram-se três lavagens, com agitação a temperatura ambiente com 30 mL de tampão 1 por 10 minutos, cada lavagem, a temperatura ambiente. Cada membrana foi mantida com 30 mL de tampão 3 por dois minutos a temperatura ambiente. As membranas foram

colocadas em cubas de pirex retangulares e incubadas no escuro com 30 mL da solução reveladora. A interrupção da reação foi realizada com 1 lavagem com tampão 4 por cinco minutos.

3.3.7 Determinação dos pesos moleculares dos fragmentos do DNA

Para a classificação das cepas de *Neisseria meningitidis*, em diferentes padrões de restrição do gene *rRNA*, o tamanho dos fragmentos foram baseados em relação ao *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* 3031 digerido com a enzima de restrição *EcoRI* incluído em cada gel (KINUE et al., 1988).

3.3.8 Distância filogenética

A distância genética entre as cepas foi calculada determinando-se o total de bandas produzidas pelas duas enzimas de restrição. O padrão de bandas de cada ribotipo foi comparado com esse total de bandas determinado. Para cada banda concordante foi dado o número 1 e para cada banda ausente foi dado o número 0. Os padrões de seqüência (1 e 0) de cada ribotipo foram comparados com todos os outros ribotipos. A análise filogenética foi baseada na matriz de distância pelo Dollop versão 3.4 do programa PHYLIP. Isto foi representado em um dendrograma construído utilizando-se o Drawgram do programa PHYLIP, versão 3.4.

3.4 Análise dos genes *porA* e *porB*

3.4.1 Amplificação dos genes *porA* e *porB*

A técnica de reação de polimerase em cadeia (*PCR*) foi utilizada para amplificação de nove genes *porA* e oito genes *porB*.

Em cada 500 µL de reação foram utilizados :

Tampão da PCR com MgCl₂ 10X (Boehringer Mannheim®) na concentração final de 1X .

Desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) 100mM (Pharmacia Biotech®) na concentração final de 200µM.

Iniciadores P14 e P22 (SACCHI et al., 1998; MAIDEN et al., 1991) para amplificação do gene *porA* e P27 e P28 (MAIDEN et al., 1992) para amplificação do gene *porB*, ambos na concentração final de 0.4 µM. Os iniciadores foram sintetizados pelo “Core Facility do Centers for Disease Control (CDC)”, Atlanta, GA, EUA,(tabelas 2 e 3).

Enzima Taq DNA polimerase (Boehringer Mannheim®), na concentração final de 25 unidades para cada 500 µl de reação.

500 ng de DNA de cada amostra

Água ultrapura estéril para um volume final de 500 µl.

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

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.

Um volume de 20 μ L de cada produto amplificado foi homogeneizado com 5,0 μ L de solução de arraste e submetido à eletroforese em gel de agarose (SIGMA®) 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®). A coloração do gel, a visualização do DNA e o registro fotográfico foram realizados como descrito no item 3.3.2.

3.4.2 Sequenciamento dos genes *porA* e *porB*

A purificação dos genes *porA* e *porB* foi feita com o *High Pure PCR product purification Kit* (Boehringer Mannheim®), seguindo as instruções do produtor. Para cada reação de *PCR* para o sequenciamento dos genes *porA* e *porB* foram utilizados 14 iniciadores (sete *forward* e sete *reverse*) (SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b), apresentados nas tabelas 3 e 4 e figuras 2 e 3. Para esse procedimento foi utilizado o *Taq Dye-deoxy terminator cycle Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA., EUA), seguindo as instruções do produtor. A purificação das reações de *PCR* para o sequenciamento foi feita através das colunas *Centri-Sep* (Princeton Separations, Adelphia, N.J., EUA) e o material purificado foi submetido a uma eletroforese em gel de acrilamida 5% e uréia 8M, usando o sequenciador automático ABI modelo 377 (Applied Biosystems®). O consenso das seqüências alinhadas e editadas foi determinado por um programa de computador da *University of Wisconsin Genetics Computer Group* (GCG) (DEVEREUX et al., 1984).

3.4.3 Números de Acesso ao *Genbank*

O esquema de SACCHI et al., 1998a; SACCHI et al., 1998b foi seguido para classificação das regiões variáveis das proteínas PorA e PorB. As seqüências dos oito genes *porB* obtidas no presente estudo foram depositadas ao *GenBank* (<http://www.nlm.nih.gov>), tabela 8.

TABELA 3 SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE *PorA*

Iniciador	Seqüência de nucleotídeo
gene <i>porA</i>	
(F) P14	GGG TGT TTG CCC GAT GTT TTT AGG
(R) P22	TTA GAA TTT GTG GCG CAA ACC GAC
Sequenciamento 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.

FIGURA 3 DIAGRAMA ILUSTRANDO O POSICIONAMENTO DOS INICIADORES DE SEQUENCIAMENTO, EM RELAÇÃO AO GENE *porA*.

TABELA 4 SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE *PorB*

Iniciador	Sequência de nucleotídeo
<i>gene porB</i>	
(F) P27	TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA GGC GT
(R) P28	TTA GAA TTT GTG ACG CAG ACC AAC
Sequenciamento do gene <i>porB</i>	
(F) 273	CGA CAT CAA TCC TTG GGA TAG C
(F) 392	GCG TAC AAT ACG CGC TTA ACG A
(F) 685	CGC TTC GGC AAC GTA ACG CCC C
(F) 731	CGA CAA TGA TGC CCT GTA C
(F) 651	GGC GGT GCC TAT AAA AGA CAT
(R) 439	GTA GCG TAC GGA AAT GAG GCG
(R) C3RVR1	CGG TTT GAG AGT TGT GCG
(R) 714	GGT GAA TCT GGT ATT TCT CAA T
(R) 294	GCT ATC CCA AGG ATT GAT GTC G
(R) 414	GTC GTT AAG CGC GTA TTG TAC G
(R) 700	TTA CGT TGC CGA AGC GGT ATG C
(R) 202	GTT ACC GAG GTC TTC TTG GCC

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

FIGURA 4 DIAGRAMA ILUSTRANDO O POSICIONAMENTO DOS INICIADORES DE SEQUENCIAMENTO, EM RELAÇÃO AO GENE *porB*.

3.5 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 obtenção de água ultrapura foi obtida pelo Sistema Milli Q de purificação de água (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA).

3.5.1 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 uma 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 em geladeira até o momento do uso.

3.5.2 Ágar soro

O *Tryptic Soy Agar* (TSA) (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 uma temperatura aproximada de 50°C, adicionou-se 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 em geladeira até o momento do uso.

3.5.3 Caldo Luria

O caldo Luria Bertani (GIBCO BRL®) 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 uma temperatura aproximada de 50°C, adicionou-se ampicilina 20 µg / mL.

3.5.4 PBS/Azida

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,345 g
NaHPO ₄ .2H ₂ 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.

3.5.5 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.

3.5.6 PBS

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,345 g
$\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,406 g
NaCl	8,52 g
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.5.7 Tampão Acetato de Sódio

CH_3COONa	4,1 g
Acertar o pH para 5,0 com ácido acético	
Água destilada estéril q.s.p.	1000,0 mL

A solução foi mantida a 4°C.

3.5.8 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.

3.5.9 Solução Reveladora (preparar na hora do uso)

Solução de AEC (Ítem 3.5.8)	4,0 mL
Tampão acetato de sódio	100,0 mL
H ₂ O ₂	200 µL

3.5.10 Solução de lise

NaCl 1,0M pH 8,0	100,0 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	100,0 mL
TRIS - HCl 1,0 M pH 8,0	50,0 mL
Água ultrapura estéril q.s.p.	1000,0 mL

3.5.11 Solução de RNase

RNase tipo I-A	0,20 g
Acetato de Sódio 0,05 M pH 5,0	100,0 mL

Após a dissolução, a solução foi aquecida em banho-maria a 90°C, por 10 minutos e distribuída em frascos e conservada a -20°C.

3.5.12 Solução de Proteinase K

Proteinase K	2,00 g
Água ultrapura estéril q.s.p.	100,0 mL

A solução foi conservada a -20°C.

3.5.13 Solução de SDS a 25%

Dodecil sulfato de sódio (SDS)	25,0 g
Água ultrapura estéril q.s.p.	100,0 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.5.14 Solução de Perclorato de sódio 5 M

Perclorato de sódio	612,0 g
Água ultrapura estéril q.s.p.	1000,0 mL

A solução foi estocada em frasco escuro a temperatura ambiente.

3.5.15 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 µL da solução TAE (item 3.5.18).

3.5.16 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 2 litros de água destilada.

3.5.17 Solução tampão Tris-EDTA (TE) - pH 8,0

Tris(hidroximetil)aminometano (Trizma base)	10 mM
Sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na ₂ EDTA)	1 mM

Após dissolução dos sais em água destilada, o pH da solução foi ajustado para 8,0. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C por 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente.

3.5.18 Solução tampão tris-acetato-EDTA (TAE) - 50 X

Trizma base	0,004 M
Na ₂ EDTA	0,002 M
Acido acético glacial	0,02 M

Após dissolução dos sais em água destilada, acrescentou-se o ácido acético glacial. A solução foi armazenada a temperatura ambiente. No momento do uso, esta solução foi diluída em água destilada.

3.5.19 Solução tampão tris-acetato-EDTA (TAE) - 1X

TAE 50X (Ítem 3.5.18)	20,0 mL
Água ultrapura estéril	1000,0 mL

3.5.20 Solução de depuração

HCl	21,55 ml
Água ultrapura estéril	978,45 ml

O ácido foi adicionado cuidadosamente à água e armazenado a temperatura ambiente.

3.5.21 Solução denaturante

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Os sais foram dissolvidos em água destilada e a solução foi armazenada a temperatura ambiente

3.5.22 Solução neutralizante pH 7,0

NaCl	1,5 M
Trizma base	0,5 M
Na ₂ EDTA	0,001 M

Após dissolução dos sais em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 4N. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C durante 15 minutos e armazenada a temperatura ambiente.

3.5.23 Solução salina com citrato (SSC) - 20x, pH 7,0

NaCl	3,0 M
Citrato trissódico	0,3 M

Os sais foram dissolvidos em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com ácido cítrico e o volume da solução completado para 1000 mL. Após autoclavação a 120°C por 15 minutos, a solução foi armazenada a temperatura ambiente.

3.5.24 Solução 1

TRIS - BASE	50 mM
EDTA	10 mM
Ajustar o pH para 8,0 com HCl	
Água ultrapura estéril	100,0 mL
Adicionar 100 µg / mL de RNase	

3.5.25 Solução 2

NaOH	0,8 g
SDS	0,1 g
Água ultrapura estéril	100,0 mL

3.5.26 Solução 3

Acetato de sódio	24,60 g
Ajustar o pH para 5,5	
Água ultrapura estéril q.s.p.	100,0 mL

3.5.27 Solução de N -laurylsarcosine a 10%

N -laurylsarcosine	10,0 g
Água ultrapura estéril q.s.p.	100,0 mL

O N-laurylsarcosine foi dissolvido em água destilada e a solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.5.28 Solução de SDS a 10%

Dodecil sulfato de sódio (SDS)	10,0 g
Água ultrapura estéril q.s.p.	100,0 mL

O SDS foi dissolvido em água destilada e a solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.5.29 Solução de hibridização

Solução SSC 20x (Ítem 3.2.23)	25,0 mL
Reagente de bloqueio (B. Mannheim)	0,5 g
N -laurylsarcosine a 10% (Ítem 3.5.27)	1,0 mL
SDS 10% (Ítem 3.5.28)	0,2 mL
Água ultrapura estéril q.s.p.	1000,0 mL

Os componentes foram misturados no momento do uso.

3.5.30 SSC 2X/SDS 0,1%

SSC 20X (Ítem 3.5.23)	100,0 mL
SDS 10% (Ítem 3.5.28)	10,0 mL
Água ultrapura estéril q.s.p.	1000,0 mL

3.5.31 SSC 0,1X/SDS 0,1%

SSC 20X (Ítem 3.5.23)	5,0 mL
SDS 10% (Ítem 3.5.28)	10,0 mL
Água ultrapura estéril q.s.p.	1000,0 mL

3.5.32 Solução Tampão 1- pH 7,5

Ácido maleico	100 mM
NaCl	150 mM

Após dissolução dos sais em água destilada, o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH. A solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C durante 15 minutos e armazenada a temperatura ambiente.

3.5.33 Solução tampão 2

Solução tampão 1 (Ítem 3.5.32)	90,0 mL
Solução bloqueadora (Ítem 3.5.33)	10,0 mL

As soluções foram misturadas no momento do uso.

3.5.34 Solução bloqueadora

Reagente bloqueador	10,0 g
Solução tampão 1 (Ítem 3.5.32)	100,0 mL

O reagente bloqueador (*Genius DNA Labeling and Detection Kit*, Boehringer-Mannheim) foi adicionado à solução tampão 1 e dissolvido a 65°C.

3.5.35 Tampão 3

TRIS - HCl 1 M pH 9,5	100,0 mL
NaCl 3 M	33,3 mL
Água ultrapura estéril q.s.p	1000,0 mL

3.5.36 Solução de nitro blue tetrazolium

NBT	0,5 g
Dimetilformamida a 70%	10,0 mL

3.5.37 Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

BCIP	0,5 g
Dimetilformamida	10,0 mL

3.5.38 Solução de revelação (preparar na hora do uso)

Solução de NBT (Ítem 3.5.36)	90,0 µL
Solução de BCIP (Ítem 3.5.37)	105,0 µL
Tampão 3 (Ítem 3.5.35)	30,0 mL

3.5.39 Tampão 4

TRIS - HCl 1 M pH 8,0	10,0 mL
EDTA 0,5 M	2,0 mL
Água ultrapura estéril q.s.p	1000,0 mL

3.5.40 TBE 10X

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

3.5.41 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

Aquecer em banho-maria até a dissolução da uréia. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poro de 0,45 μm (Millipore Corporation).

Em uma proveta graduada de 50 mL, adicionar a solução de acrilamida filtrada e 5 mL de TBE 10X. Completar o volume para 50 mL com água ultrapura estéril. Adicionar 250 μl persulfato de sódio (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) a 0.1% e 30 μl de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)

Misturar delicadamente e aplicar entre as placas de vidro do sequenciador e deixar a temperatura ambiente durante no mínimo 2 horas para polimerização.

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição dos epítomos de sorotipo 4, 7 e 10 em 630 cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B isoladas no Brasil durante 1997.

Foram caracterizadas, no ano de 1997, 512 (81,3%) cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B sorotipo 4. Dentre essas cepas que apresentam o epítomo 4 (n=512), o epítomo 7 está também representado em 95,5% (n=489); já o epítomo 10 aparece somente em 3,9% (n=20), sendo identificados como fenótipos B:4,7 e B:4,10; respectivamente.

Os epítomos 7 e 10 , separadamente, foram caracterizados em 0.95% (n=6) e em 0.15% (n=1) , respectivamente. Apenas uma cepa apresentou somente o epítomo 4 (B:4) e 2 cepas apresentaram os fenótipos B:4,1 (n=1) e B:4,21 (n=1), (tabela 5).

TABELA 5 DISTRIBUIÇÃO EM NÚMERO E PERCENTUAL DE SOROTIPOS 4, 7 E 10 EM 630 CEPAS DE *Neisseria meningitidis* SOROGRUPO B ISOLADAS NO BRASIL DURANTE 1997

Sorotipo	<i>n</i>	%
4	1	0.15
7	6	0.95
4,1	1	0.15
4,7	489	77.8
4,21	1	0.15
17,7	8	1.26
19,7	6	0.95
19,7,1	1	0.15
10	1	0.15
4,10	20	3.11
17,10	2	0.30
Outros	94	14.88
Total	630	100

4.2 Frequência da distribuição dos sorosubtipos de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, segundo os sorotipos 4; 4,1; 4,7; 4,21; 7 e 10 isoladas no Brasil durante 1997.

Nesse período, o fenótipo B:4,7 esteve presente em 489 (77,8%) das cepas estudadas. Compondo esse fenótipo, os sorosubtipos P1.15 e P1.7,1 aparecem em 472 ocasiões, ou seja, em 75% das cepas B:4,7; sendo então identificadas como fenótipos B:4,7:P1.15 e B:4,7:P1.7,1.

O fenótipo B:4,10 correspondeu a 3,11% (n=20) do total das cepas estudadas, o sorosubtipo mais freqüente associado a esse grupo foi o P1.9, perfazendo 55% dessas cepas, sendo identificadas como B:4,10:P1.9, (tabela 6).

TABELA 6 FREQUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DOS SOROSUBTIPOS DE *Neisseria meningitidis* SOROGRUPO B, SEGUNDO OS SOROTIPOS 4; 4,1; 4,7; 4,10; 4,21; 7 E 10 ISOLADAS NO BRASIL DURANTE 1997.

Sorosubtipos	4		4,1		4,7		4,10		4,21		7		10		Outros	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	Sorotipos															
P1.1	-	-	-	-	1	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1.3	1	0.15	-	-	6	1.00	-	-	-	-	1	0.15	-	-	3	0.47
P1.5,2	-	-	-	-	-	-	1	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-
P1.7,1	-	-	-	-	70	11.0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0.32
P1.7,16	-	-	-	-	1	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	20	3.2
P1.9	-	-	1	0.15	1	0.15	11	1.70	1	0.15	-	-	-	-	9	1.4
P1.12,13	-	-	-	-	-	-	2	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-
P1.14	-	-	-	-	-	-	2	0.32	-	-	-	-	-	-	1	0.15
P1.15	-	-	-	-	402	64.0	3	0.47	-	-	5	0.80	-	-	22	3.50
P1.22a,14	-	-	-	-	1	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	15	2.40
nt	-	-	-	-	7	1.20	1	0.15	-	-	-	-	1	0.15	16	2.50
Outros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	3.60
Total	1	0.15	1	0.15	489	77.8	20	3.11	1	0.15	6	0.95	1	0.15	111	17.54

4.3 Diversidade genética entre as cepas de *Neisseria*.

A diversidade genética das cepas estudadas, 102 cepas de *Neisseria meningitidis* e 3 cepas do gênero *Neisseria*, pela ribotipagem revelou dez diferentes padrões de restrição quando se utilizou a endonuclease de restrição *ClaI* e outros cinco com a *EcoRV*, (tabela 7). Associando os perfis de restrição obtidos, pode-se classificar essas cepas em 12 ribotipos (A - L), como mostra a tabela 7.

A figura 4 representa os perfis de padrão de restrição, após transferência dos fragmentos clivados com *ClaI*, onde podem ser diferenciados alguns padrões obtidos com a respectiva endonuclease.

Por meio de análise do dendrograma apresentado, as cepas expressando o epítipo 4 na PorB foram divididas em nove ribotipos (A, B, C, D, E, F, I, G e H). Os diferentes ribotipos que apresentaram similaridade de bandas igual ou maior que 85%, produzidas pelas duas endonucleases, foram combinadas em dois grupos de ribotipos, denominados, Rb-1 e Rb-2, (figura 5),

O Rb-1 é composto pelo fenótipo B:4,10 que apresenta os ribotipos C e D. O Rb-2 é composto pelo fenótipo B:4,7 que apresenta os ribotipos A, B, E, F e I. A comparação entre os grupos, Rb-1 e Rb-2, mostra que houve diferença de 25% entre suas bandas.

Dentre as amostras bacterianas testadas, foram observados distintos ribotipos o fenótipo B:4,1 e B:4,21. A diversidade de ribotipos pode ser

também observada para os testes com as *N. sicca*, *N. polysacchareae* e *N. cinereae*.

TABELA 7 REPRESENTAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS 105 CEPAS DE NEISSERIA ANALISADAS E SUAS RESPECTIVAS ORIGENS

Cepa	Estado	Cidade	Sorogrupo Sorotipo	Soro- subtipo	Padrão de restrição		Ribotipo
					<i>Clal</i>	<i>EcoRV</i>	
N.615	DF	Brasília	B:4	P1.3	2	1	F
N.633	SP	Taubaté	B:4,1	P1.9	5	1	G
N.29	SP	Osasco	B:4,7	P1.3	2	1	F
N.27	SP	São Paulo	B:4,7	P1.3	2	1	F
N.435	PE	Recife	B:4,7	P1.3	2	1	F
N.436	PE	Recife	B:4,7	P1.3	2	1	F
N.875	BA	Salvador	B:4,7	P1.3	2	1	F
N.1133	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	P1.3	2	1	F
N.454	SP	São Paulo	B:4,7	P1.1	1	1	A
N.51	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.230	ES	Vitória	B:4,7	P1.7,1	3	1	B
N.413	SP	São Paulo	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.547	SE	Aracaju	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.682	PE	Recife	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.921	SE	Aracaju	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.1020	BA	Salvador	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.1153	PE	Recife	B:4,7	P1.7,1	1	1	A
N.421	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	P1.7,16	1	1	A
N.950	BA	Salvador	B:4,7	P1.9	1	1	A
N.785	SP	Sorocaba	B:4,7	P1.22a,14	1	1	A
N.25	SP	Taubaté	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.45	SP	Campinas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.109	SP	Campinas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.145	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.200	SP	São José Rio Preto	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.204	BA	Valença	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.243	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.279	PE	Recife	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.334	ES	Vitória	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.365	DF	Brasília	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.403	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.404	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.413	SP	Campinas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.423	RS	Porto Alegre	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.439	ES	Vitória	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.440	PE	Recife	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.481	PE	Recife	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.523	BA	Cruz das Almas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.555	SP	São José Rio Preto	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.589	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.630	BA	Salvador	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.662	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.678	PR	Curitiba	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.722	BA	Salvador	B:4,7	P1.15	1	1	A

CONTINUAÇÃO

Cepa	Estado	Cidade	Sorogruppo Sorotipo	Soro- subtipo	Padrão de restrição		Ribotipo
					Clal	EcoRV	
N.770	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.798	DF	Brasília	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.825	SP	Santo André	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.863	SP	Osasco	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.887	SP	Campinas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.912	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.915	PE	Recife	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.934	SP	Campinas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.963	PE	Recife	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.985	DF	Brasília	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1001	SE	Aracaju	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1029	SP	Santos	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1062	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1093	BA	Salvador	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1116	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1122	BA	Salvador	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1131	SP	Campinas	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1162	SP	Santos	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1194	SP	Taubaté	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1212	BA	Salvador	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.1236	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.44/89	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.150/88	SP	São Paulo	B:4,7	P1.15	1	1	A
N.195	SP	Ribeirão Preto	B:4,7	nt	1	1	A
N.507	RS	Porto Alegre	B:4,7	nt	1	3	E
N.706	MG	Belo Horizonte	B:4,7	nt	1	1	A
N.726	MG	Belo Horizonte	B:4,7	nt	7	1	I
N.966	SP	São Paulo	B:4,7	nt	1	1	A
N.1187	SP	Taubaté	B:4,7	nt	1	1	A
N.1208	BA	Salvador	B:4,7	nt	1	1	A
N.1002	SP	Ribeirão Preto	B:4,10	P1.5,2	4	3	D
N.288	BA	Salvador	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.513	BA	Salvador	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.420	SP	São Paulo	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.480	PR	Curitiba	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.539	ES	Vitória	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.665	BA	Salvador	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.676	SP	São Paulo	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.716	SP	São José Rio Preto	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.734	SP	Ribeirão Preto	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.771	SP	Ribeirão Preto	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.862	SP	Campinas	B:4,10	P1.9	2	3	C
N.527	SP	São José Rio Preto	B:4,10	P1.12,13	2	3	C
N.922	SE	Aracaju	B:4,10	P1.12,13	2	3	C
N.25	ES	Vitória	B:4,10	P1.14	2	3	C
N.388	SP	Ribeirão Preto	B:4,10	P1.14	2	3	C
N.23	SP	Ribeirão Preto	B:4,10	P1.15	2	3	C

CONTINUAÇÃO

Cepa	Estado	Cidade	Sorogrupo Sorotipo	Soro- subtipo	Padrão de Restrição		Ribotipo
					<i>ClaI</i>	<i>EcoRV</i>	
N.48	SP	Campinas	B:4,10	P1.15	2	3	C
N.363	DF	Brasília	B:4,10	P1.15	2	3	C
N.1196	DF	Brasília	B:4,10	nt	2	3	C
N.919	PE	Recife	B:4,21	P1.9	6	1	H
N.1031	SP	São José Campos	B:7	P1.3	2	3	C
N.870	SP	Campinas	B:7	P1.15	1	1	A
N.927	SP	São Paulo	B:7	P1.15	1	1	A
N.56	RS	Rio do Sul	B:7	P1.15	1	1	A
N.948	PR	São José Pinhais	B:7	P1.15	1	1	A
N.1003	SP	São Paulo	B:7	P1.15	1	1	A
N.35	SP	São Paulo	B:10	nt	2	3	C
N.127		<i>N. sicca</i>			8	2	J
N.755		<i>N. cinereae</i>			9	4	K
N.320		<i>N. polysacchareae</i>			10	5	L

BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo, PR, Paraná; SE, Sergipe; SP, São Paulo, RS, Rio Grande do Sul; MG, Minas Gerais; PE, Pernambuco.

FIGURA 5. Fragmentos de restrição, obtidos com a endonuclease *Cla*I, hibridizados com a sonda pKK3535 marcada com digoxigenina -11-dUTP. LINHA 1, *Haemophilus influenzae* biogrupo *aegyptius* 3031 , LINHA 2, N.726 (PADRÃO DE RESTRIÇÃO 7), LINHA 3, N.1002 (PADRÃO DE RESTRIÇÃO 4), LINHA 4, N.230 (PADRÃO DE RESTRIÇÃO 3), LINHA 5, N.44/89 (PADRÃO DE RESTRIÇÃO 1)

FIGURA 6 SIMILARIDADE DAS BANDAS ENTRE OS RIBOTIPOS DAS CEPAS DO GÊNERO NEISSERIA, EM PERCENTUAL.

4.4 Sequenciamento do gene *porB*.

A figura 7 apresenta o produto amplificado do gene *porB* em gel de agarose a 1%. O gene *porB* apresenta 900 pares de bases (FEAVERS et al., 1992) que codifica a proteína de classe 3. Entretanto, o gene *porB* da cepa N.1031 apresentou somente 850 pares de bases, o que resultou em uma migração mais lenta no gel de agarose.

Entre 630 cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B isoladas durante 1997, um total de oito cepas foram caracterizadas por um único epítipo da PorB, representado pelos sorotipos 4 (n=1), 7 (n=6) ou 10 (n=1). O sequenciamento de nucleotídeos do gene *porB* mostrou a presença de substituições ou deleções nas VR1 ou VR3 destas cepas. As VR1 e VR3 em seis cepas das oito seqüenciadas apresentaram variantes dos sorotipos 4 e 7, sendo duas variantes para o sorotipo 4, variantes 4b e 4c, e uma variante para o sorotipo 7, variante 7b. A cepa N.56 apresentou uma nova seqüência na VR1 na PorB, VR1-E e a cepa N.1031 apresentou uma completa deleção na VR1 (VR1-Del). Essas oito cepas apresentaram somente os epítipos do sorotipo D ou seu variante na região variável 2, VR2-D e VR2-De. Essas cepas apresentaram na região variável 4, epítipos variantes do sorotipo 14, identificados como VR4-14a e VR4-14d, (tabela 8).

A tabela 9 demonstra as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos tipos de VRs da PorB das oito cepas tipadas por sequenciamento.

FIGURA 7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PRODUTO AMPLIFICADO DO GENE *porB*, PELA TÉCNICA DE *PCR*. LINHA 1. MARCADOR MOLECULAR (1Kb); LINHA 2. N.615; LINHA 3. N.870; LINHA 4. N.927; LINHA 5. N.56; LINHA 6. N.948; LINHA 7. N.1003; LINHA 8. N..35; LINHA 9. N.1031; LINHA 10. CONTROLE NEGATIVO

TABELA 8 CARACTERIZAÇÃO DAS OITO CEPAS DE *Neisseria meningitidis* B:4, B:7 E B:10 QUANTO AO SOROGRUPO, SOROTIPO, SOROSUBTIPO, TIPO DE REGIÃO VARIÁVEL E RIBOTIPO ASSOCIADAS AO SEU NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK.

Cepa	Soro-grupo	Soro-tipo	Soro-Subtipo	VRs da PorB (VR1,VR2,VR3,VR4)	Ribotipo	Número de Acesso ao GenBank
N.615	B	4	P1.3	<u>4,D,7b,14a</u>	F	<u>AF060525</u>
N.870	B	7	P1.15	<u>4c,D,7,14d</u>	A	<u>AF051531</u>
N.927	B	7	P1.15	<u>4b,Dc,7,14a</u>	A	<u>AF043065</u>
N.56	B	7	P1.15	<u>E,D,7,14a</u>	A	<u>AF060526</u>
N.948	B	7	P1.15	<u>4b,D,7,14a</u>	A	<u>AF060527</u>
N.1003	B	7	P1.15	<u>4b,D,7,14a</u>	A	<u>AF060528</u>
N.1031	B	7	P1.3	<u>Del^a,De,7,14a</u>	F	<u>AF060529</u>
N.35	B	10	nt ^b	<u>4b,D,10,14a</u>	C	<u>AF051532</u>

^aregião deletada

^bnão sorosubtipável

TABELA 9 TIPOS E SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS NA PROTEÍNA PorB DAS CEPAS *Neisseria meningitidis* SEQUENCIADAS

Região Variável (VR)	Tipo de VR		Sequência	
		PorB	Nucleotídeos	Aminoácidos
VR1		<u>4</u>	GAGCACAATCGAGGTCAGGTGGTTAGCGTTGAA	EHNGGQVVSVE
		<u>4b</u>	A.....	K.....
		<u>4c</u>	T.....	...V.....
VR2		<u>E</u>	GATTACCAGGACGGTCAAGTTTATAGCGTTGAA	DYDGGQVYSVE
		<u>D</u>	CAGGATGTGGATGACGTGAAG	QDVDDVK
		<u>Dc</u>		
		<u>De</u>	A.....	...N..
VR3		<u>7</u>	GTTGAAGACAAATTAT	VEDNY
		<u>7b</u>		
VR4		<u>10</u>	GCTTTGCCAAACGACAAT	ALPNDN
		<u>14a</u>	TCGTTTGATGATGCAGACTTAAGCAACGAT	SFDDADLSND
		<u>14d</u>	A.....	..N.....

Símbolos : -, nucleotídeo ou aminoácido deletado em relação à sequência superior
 ., nucleotídeo ou aminoácido idêntico à sequência superior

4.5 Sequenciamento do gene *porA*.

A figura 8 apresenta o produto amplificado do gene *porA* em gel de agarose a 1%. O gene *porA* apresenta cerca de 1200 pares de bases.

Entre as 512 cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B sorotipo 4, nove permaneceram identificadas como não sorosubtipáveis, ou seja, não reagiram com o painel de mAbs disponível. As VR1 e VR2 dessas cepas apresentaram um alto grau de variação. Caracterizaram-se dez diferentes seqüências nessas VRs. Identificaram-se cinco seqüências na VR1 (VR1-E; VR1-Eb; VR1-Eg; VR1-5b; VR1-7b) e cinco seqüências na VR2 (VR2-A, VR2-Ba; VR2-10a; VR2-10i; VR2-15a); três dessas cepas, quando sequenciadas, mostraram-se como pertencentes ao sorosubtipo P1.13a, e uma cepa ao sorosubtipo P1.20, (tabela 10).

A tabela 11 mostra as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos tipos de VRs da PorA das nove cepas tipadas por sequenciamento.

FIGURA 8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DO PRODUTO AMPLIFICADO DO GENE *porA* PELA TÉCNICA DE *PCR*. LINHA 1. MARCADOR MOLECULAR (1Kb); LINHA 2. N.35; LINHA 3. N.1196; LINHA 4. N.195; LINHA 5. N.507; LINHA 6. N.706; LINHA 7. N.726; LINHA 8. N.966; LINHA 9. N.1187; LINHA 10. N.1208.

TABELA 10 CARACTERIZAÇÃO DAS NOVE CEPAS DE *Neisseria meningitidis* NÃO SOROSUBTIPÁVEIS QUANTO AO SOROGRUPO, SOROTIPO, SOROSUBTIPO, TIPO DE REGIÃO VARIÁVEL E RIBOTIPO.

Cepa	Sorogrupo	Sorotipo	Soro-subtipo	VRs da PorA (VR1,VR2)	Ribotipo
N.3597	B	10	nt ^a	P1. <u>Eb</u> , <u>10a</u>	C
N.119697	B	4,10	nt	P1. <u>Eg</u> , <u>A</u>	C
N.19597	B	4,7	nt	P1. <u>5b</u> , <u>10i</u>	A
N.50797	B	4,7	nt	P1. <u>7b</u> , <u>13a</u>	E
N.70697	B	4,7	nt	P1. <u>20</u> , <u>Ba</u>	A
N.72697	B	4,7	nt	P1. <u>7b</u> , <u>13a</u>	I
N.96697	B	4,7	nt	P1. <u>7b</u> , <u>13a</u>	A
N.118797	B	4,7	nt	P1. <u>E</u> , <u>15a</u>	A
N.120897	B	4,7	nt	P1. <u>E</u> , <u>15a</u>	A

^anão sorosubtipável

TABELA 11 TIPOS E SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DAS REGIÕES VARIÁVEIS DA PROTEÍNA PorA DE NOVE CEPAS DE *Neisseria meningitidis* NÃO SOROSUBTÍPÁVEIS SEQUENCIADAS

Região Variável (VR)	Tipo de VR PorA	Sequência	
		Nucleotídeos	aminoácidos
VR1	<u>5b</u>	CCGCTCCCAAAATATTCAACCTCAGGTTACTAAGGC	PLPNIQPOVTKR
	<u>7b</u>	GCACAAGCCGCTAACGGTGGAGCGAGCGGTCAGGTAAAA	AQAANGGASGVK
	<u>20</u>	CAGCCCCAAACCGCTAACTACCTCAGCAAGCGGTAAAGTAAAA	QPQTANTQQGGKVK
	<u>E</u>	CCACCCTCAAAGGTCAGACGGGCAATAAAGTTACTAAGGCG	PPSKGQTGNKVTKG
	<u>Eb</u>	.A.....GT.....	Q.....V.....
VR2	<u>Eq</u>	T.....	I..
	<u>A</u>	ACTTATACTGTGGATAGTAGTGGTGTGTTACTCCCGTTCCT	TYTVDSSGVVTPVP
	<u>10a</u>	CATTTTGTTCAGGATAAGAAAGGTCAGCGGCTACTCTCGTTCCG	HFVQDKKGPPPLVP
	<u>10i</u>	T.....	WL.....
	<u>13a</u>	TATTGGACTACTGTGAATACCGGTAGTGTCTACTACTACTACTTTTCGTTCCG	YWTTVNTGSAITTTTFVP
	<u>15a</u>	CATTATACTAGGCAGACAATACTGATGTTTCGTTCCG	HYTRQNNTDVFPV
	<u>Ba</u>	CATTGGAACTACTGTGTATAACACTAACGGTACTACTACTACTACTTTTCGTTCCG	HWNTVYNTNGTTTTTTTFVP

Símbolos : -, nucleotídeo ou aminoácido deletado em relação à sequência superior
 ., nucleotídeo ou aminoácido idêntico à sequência superior

5. DISCUSSÃO

A caracterização do meningococo em sorotipos e sorosubtipos tem como objetivo principal 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 definida área geográfica para finalidade de ensaios vacinais é de fundamental importância.

Neisseria meningitidis sorogrupo B sorotipo 4 sorosubtipo P1.15 (B:4:P1.15) tem sido a cepa prevalente causadora da doença meningocócica no Brasil e é responsável por uma epidemia na Grande São Paulo desde 1988 (SACCHI et al., 1988; SACCHI et al., 1998). Durante o ano de 1997, o sorotipo 4 foi responsável por 81.2% das cepas sorogrupo B sorotipadas, e o sorosubtipo P1.15 foi caracterizado em 79% das cepas sorotipo 4.

Ao painel de mAbs, anteriormente utilizados na sorotipagem pelo Instituto Adolfo Lutz, foram acrescentados dois outros, para os sorotipos 7 e 10, no ano de 1997. A partir de então, são usados na rotina de sorotipagem das cepas de meningococo enviadas ao CRNM - Instituto Adolfo Lutz. A adição desses novos mAbs permitiu a caracterização de um epítopo adicional na PorB principalmente em cepas identificadas como somente sorotipo 4.

Urwin et al., 1998 demonstraram que a caracterização de somente um único epítopo, o sorotipo 4, é um pobre indicador de relação clonal entre isolados, pois a proteína PorB contém seqüências que podem ser altamente variáveis.

A proposta inicial deste estudo foi demonstrar que a simples caracterização de um epítopo adicional na PorB poderia dividir cepas de meningococo sorotipo 4 em grupos geneticamente relacionados. A caracterização de um segundo epítopo na proteína PorB dividiu as cepas sorotipo 4 em subgrupos (4; 4,1; 4,7; 4,10 e 4,21), ou seja, foram divididos em cinco subgrupos fenotipicamente diferentes.

Aplicou-se a técnica da ribotipagem nesses subgrupos fenotipicamente diferentes e pode-se caracterizar nove distintos ribotipos. Pudemos também caracterizar dois grupos de ribotipos geneticamente distintos, Rb-1 e Rb2, esses dois grupos são representados marcadamente pelos sorotipos 4,10 e 4,7 respectivamente. O dendrograma gerado pela ribotipagem revelou que as cepas podiam ser agrupadas em simples ribotipos e/ou em grupos de ribotipos geneticamente relacionados, isso independente do seu sorosubtipo, ou seja, foi fundamental a determinação de um segundo epítipo de sorotipo. Vale observar que isolamos somente uma cepa sorotipo 4,1 e uma cepa sorotipo 4,21 que também apresentaram distintos ribotipos durante o ano de 1997. Necessitaríamos de um número maior de amostras do período para um estudo mais detalhado de relação clonal.

No nosso estudo, os dados da ribotipagem puderam ser correlacionados com os da sorotipagem, pois determinado ribotipo ou grupo de ribotipo correspondeu ao segundo epítipo na PorB determinado junto ao sorotipo 4. Esses achados reforçam o estudo de Urwin et al., 1998 citado acima.

Nossos resultados sugerem que a caracterização de um epítipo adicional na PorB pode, com certeza, melhorar a correlação entre as características fenotípica e genotípica de cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B.

SACCHI et al, 1998, demonstraram que o clone epidêmico de *Neisseria meningitidis* responsável pela DM na Grande São Paulo, no período de 1990 a 1996, pertenciam ao ribotipo 1 (Rb1), utilizando a endonuclease de restrição *ClaI* e representavam 68% das cepas de meningococo B:4:P1.15. Nossos resultados confirmam os de SACCHI et al, 1998 e ainda caracterizou-se um segundo epítipo na PorB, o sorotipo 7, entre as cepas pertencentes ao clone epidêmico, fenótipo B:4:P1.15.

As observações de Arhin et al., 1998, sequenciando VRs na proteína PorA, sugeriam que as combinações de famílias de VR não ocorriam como um evento aleatório, mas que, preferencialmente, famílias específicas de VRs estariam associadas exclusivamente com outras famílias de VRs. Baseando-se em tal informação fizemos a tipagem de VRs na PorB em oito cepas, e demonstramos que essa idéia pode ser aplicada também para proteína PorB. Caracterizou-se dessa forma, as variantes da família sorotipo 4, as 4b e 4c, correlacionadas com os sorotipos 7 e 10; e a variante da família sorotipo 7, a 7b, correlacionada com o sorotipo 4. A presença de uma nova sequência na VR1 (N.56) e uma completa deleção na VR1 na cepa N.1031 pode explicar a falta da reatividade das cepas N.56 e N.1031 com o painel de mAbs de sorotipo.

O sequenciamento das VR2 e VR4 dessas cepas demonstrou que pertencem à mesma família de VR, o que nos leva a concluir que estas regiões não se prestaram para melhoria da correlação fenotípica e genotípica entre as cepas.

Entre as 516 cepas de *Neisseria meningitidis* sorotipo 4, nove não reagiram com o painel de mAbs para sorosubtipo disponível, dessa forma aplicou-se sequência de DNA para caracterizar as regiões variáveis da proteína PorA.

Nossos resultados de tipagem das VRs revelaram no mínimo duas razões que podem explicar a inabilidade do painel de mAbs em caracterizar algumas dessas cepas. Primeiro, um painel incompleto de mAbs foi usado na sorotipagem. Os resultados da tipagem de VR puderam demonstrar que três cepas dos nossos isolados eram pertencentes ao sorosubtipo P1.13a e uma cepa pertencente ao sorosubtipo P1.20. Existem mAbs para estes sorosubtipos, P1.13a e P1.20, mas não estavam à nossa disponibilidade no momento desse estudo, por este motivo, não foram incluídos em nosso painel. Certamente, se esses mAbs estivessem disponíveis estaríamos hábeis em caracterizar esses epítomos em quatro cepas adicionais.

A segunda razão pela falta de reatividade dessas cepas com o painel de mAbs de sorosubtipo está associada ao alto grau de variação na seqüência de aminoácidos que encontramos nas regiões variáveis 1 e 2 da proteína PorA, o que reforça estudos anteriores que demonstraram o alto grau de variação nestas regiões (Feavers et al., 1996; Arhin, et al., 1998; Sacchi et al., 1998b).

A pobre imunogenicidade do polissacáride de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B tem indicado, para um melhor estudo, as variações das proteínas PorA e PorB. Essas porinas têm se tornado o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas com melhor eficácia para esse sorogrupo.

Por razões econômicas e pela complexidade da tipagem genotípica, a sorotipagem ainda continuará sendo o método de escolha para estudos epidemiológicos. A utilização de um painel completo de mAbs, se presta a adquirir conhecimentos mais precisos e amplos, que fornecem subsídios suficientes para se estabelecer estratégias necessárias para as ações de Saúde Pública.

6. CONCLUSÕES

No ano de 1997, 81.3% das cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B sorotipadas pertenciam ao sorotipo 4.

A utilização do painel de mAbs separou as cepas de meningococo sorogrupo B sorotipo 4 em cinco distintos grupos, sorotipos : 4; 4,1; 4,7; 4,10 e 4,21. O fenotipo B:4,7 foi caracterizado em 77.8% das cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B isoladas no Brasil em 1997 e o sorosubtipo P1.15 foi caracterizado em 64% das B:4,7.

A ribotipagem das cepas expressando sorotipo 4 apresentou nove ribotipos. Dois grupos de ribotipos geneticamente relacionados foram formados por cepas B:4,7 e B:4,10, independentemente dos seus sorosubtipos.

O sequenciamento do gene *porB* mostrou uma estreita correlação entre os sorotipos 7 e 10 com o sorotipo 4. O sequenciamento do gene *porA* mostrou um alto grau de variabilidade nas VRs entre as cepas não sorosubtipáveis.

A caracterização de múltiplos epítomos de sorotipo pode melhorar a correlação entre os métodos fenotípico e genotípico para cepas de meningococo sorogrupo B.

7.0. RESUMO

Comparamos os resultados obtidos por meio de sorotipagem com o painel de mAbs acrescido dos mAbs para os sorotipos 7 e 10 , produzidos pelo Instituto Adolfo Lutz com os resultados obtidos pela ribotipagem.

O estudo incluiu 95 cepas pertencentes ao sorogrupo B que expressaram o sorotipo 4, representados pelos fenótipos B:4; B:4,1; B:4,7; B:4,10 e B:4,21. A ribotipagem utilizando a endonuclease de restrição *Cla*I dividiu as cepas em dez ribotipos e a endonuclease *EcoRV* em outros cinco padrões. Quando os padrões de bandas foram combinados, formaram-se 12 ribotipos (Rb A-L). Ribotipos com 85% de similaridade entre as bandas foram combinados em grupos , Rb-1, incluindo os ribotipos C e D (sorotipo B:4,10) e Rb-2, incluindo os ribotipos A, B, E, F e I (sorotipo B:4,7). O Rb-H (sorotipo B:4,1) e Rb-G (sorotipo B:4,21) representaram distintos ribotipos diferindo dos dois primeiros grupos por mais de 25% de diferença entre as bandas.

Nossos resultados sugerem que a caracterização de múltiplos epítomos de sorotipo podem melhorar a correlação entre o método fenotípico e genotípico para cepas de meningococo sorogrupo B.

8.0. ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the correlation between phenotypic- and genotypic- methods for typing *Neisseria meningitidis*. We compare the results obtained by serotyping of PorB epitopes using an expanded panel of monoclonal antibodies (MAb) including MAb 7 and MAb 10, with results obtained by RFLP of *rRNA* genes (ribotyping). The study included a total of 95 serogroup B strains that express epitope 4 representing the phenotypes B:4; B:4,1; B:4,7; B:4,10, and B:4,21. The ribotypes obtained using *Cla*I or *Eco*RV endonucleases divided the strains into ten and five different patterns, respectively. When banding patterns for the two enzymes were combined, twelve unique ribotypes were obtained (Rb A-L). Particular ribotypes with $\geq 85\%$ identical bands were combined into groups, RbGroup-1, including Rbs C and D (B:4,10 strains), and RbGroup-2 including Rbs A, B, E, F, and I (B:4,7 strains). The Rb-H (B:4,1 strains) and Rb-G (B:4,21 strains) represent distinct ribotypes differing from the first two groups by more than 25% of band mismatches. The phenotypic characterization of more than one PorB VR epitope on the same PorB protein was able to divide our collection of B:4 strains in groups of strains genetic related. This additional characterization of PorB epitopes improved the correlation between these two methods of typing *N.meningitidis*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABDILLAH, H. & POOLMAN, J. T. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.48, p.367-371, 1987.
- ACHTMAN, M. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.3, p.186-192, 1995.
- 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.**, Washington, v.63, p.1484-1490, 1995.
- BINGEN, E. H., DENAMUR, E. ELION J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. **Clin. Microbiol. Rev.**, Chicago, v.3, p.311-327, 1994.
- 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**, London, v.338, p.1093-1096, 1991.

*De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1996.

BOSLEGO, J., GARCIA, J., CRUZ, C., ZOLLINGER, W. D., BRANDT, B., RUIZ, S., MARTINEZ, M., ARTHUR, J., UNDERWOOD, P., SILVA, W., MORAN, E., HANKINS, W., GILLY, J., MAYS, J., The Chilean National Committee for meningococcal disease. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. **Vaccine**, London, v.13, p.821-829, 1995.

BRENNER, D. J., McWHORTER, A. C., KNUSTON, J. K., L., STEIGERWALT, A. G. *Escherichia vulneris*: a new species of Enteriobacteriaceae associated with humam wounds. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.15, p. 1133-40, 1982.

BUTCHER, S., SARVAS, M., RUNENBERG-NYMAN, K. Class-3 porin protein of *Neisseria meningitidis*: cloning and structure of the gene. **Gene**, Amsterdam, v.105, p.125-128, 1991.

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 Leeuwenhock J. Microbiol.**, Amsterdam, v.53, p.389-394, 1987.

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

DEVEREUX, J. P., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. **Nucleic Acids Res.**, London, v.12, p.387-395, 1984.

- DEVOE, I. W. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.46, p. 162-190, 1992.
- DORSET, D. L., ENGEL, A., MASSALS, A. A., ROSENBUSCH, J. P. Three dimensional structure of a membrane pore. **Biophys. J.**, New York, v.45, p.128-129, 1984.
- ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.7, p.482-487, 1999.
- 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.**, Washington, v.60, p.3620-3629, 1992.
- FEAVERS, I. M., FOX, A. J., GRAY, S., JONES, D. M., MAIDEN, M. C. J., Antigenic diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has implications for epidemiological analysis and vaccine design. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, Washington, 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.**, Washington, v.37, p.3883-3887, 1999.
- FRASCH, C. E. & CHAPMAN, S. S. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. I Serological typing by a microbactericidal method. **Infect. Immun.**, Washington, 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.** Washington, v.6, p.127-133, 1972.b

FRASCH, C. E. & MOCCA, L. F. Heat-modifiable outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and their organization within the membrane. **J. Bacteriol.**, Baltimore, 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. of Infect. Dis.**, Chicago, 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.**, Oxford, v.9, p.101-107, 1986.

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

GOLD, R. & WYLE, F. A. New classification of *Neisseria meningitidis* by means of bactericidal reactions. **Infect. Immun.**, Washington, 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.**, New York, v.129, p.1327-1348, 1969.

GOTSCHLICH, E. C., CORNELISSEN, C., HILL, S. A., KOOMEY, J. M., MARCHAL, C., MEYER, T. F. The mechanisms of genetic variation of gonococcal pili. Iron-inducible proteins of *Neisseria*. In: **Neisseria 90**. ACHTMAN, M., KOHL, P., MARCHAL, C., MORELLI, G., SEILER, A., THIESEN, B. eds. Berlin, Walter de Gruyter, p.405-412, 1990.

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

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 *Neisseria* outer membrane. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.10, suppl. 2, p.287-295, 1988.

GRIMONT, F. & GRIMONT, P. A. D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as a potential taxonomic tools. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, Paris, v.137B, p.165-175, 1986.

HART, C. A. & ROGERS, T. R. F. Meningococcal disease. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.39, p.3-25, 1993.

HECKELS, J. E. Structure and function of pili of pathogenic *Neisseria* species. **Clin. Microbiol. Rev.**, Chicago, suppl. 2, p.29-34, 1989.

- IRINO, K., GRIMONT, F., CASIN, I., GRIMONT, P. D. A. & THE BRAZILIAN PURPURIC FEVER STUDY GROUP. rRNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* strains associated with Brazilian purpuric fever. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, Washington, p.1535-1538, 1988.
- JARVIS, J. A. & VEDROS, N. A. Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. **Infect. Immun.**, Washington, v.55, p.174-180, 1987.
- LEHMANN, A. K., HALSTENSEN, A., AABERGE, I. S., HOLST, J., MICHAELSEN, T. E., SORNES, S., WETZLER, L. M., GUTTORMSEN, H. K. Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PorA and PorB. **Infect. Immun.**, Washington, v.67, p.2552-2560, 1999.
- LIND, I. & WEISS, N. Epidemiological markers in *Neisseria meningitidis*: An estimate of the performance of genotyping vs phenotyping. **Scand. J. Infect. Dis.**, Copenhagen, v.30, p.69-75, 1998.
- 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.
- MACHADO, M. L'épidémie de méningite cérébrospinale au Brésil. **Méd. Hyg.**, Paris, 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.**, Oxford, v.5, p.727-736, 1991.
- 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.**, Washington, v.95, p.3140-3145, 1998.
- MARIE, S., HOEIJMAKERS, J. H., J., POOLMAN, J. T., ZANEN, H. C. Filter radioimmunoassay, a method for large escale serotyping of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.20, p.255-258, 1984.
- MASLOW, J. N., MULLIGAN, M. E., ARBEIT, R. D., Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.153-164, 1993.
- MASLOW, J. & MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Thorofare, v.9, p.595-604, 1996.
- MASSON, L. & HOLBEIN, B. E. Influence of nutrient and low pH on serogroup B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide levels: correlation with virulence for mice. **Infect. Immun.**, Washington, v.47, p.465-471, 1985.

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.**, New York, v.171, p.1871-1882, 1990.

McGUINNESS, B. T., LAMBDEN, 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.**, Oxford., v.7, p.505-514, 1993.

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

MILAGRES, L. G., GORLA, M. C. G., SACCHI, C. T., RODRIGUES, M. M. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian Children after immunization with an outer membrane vaccine. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, p.4755-4761, 1998.

MOORE, P. S. Meningococcal meningitis in Sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, 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.**, Chicago, v.129, p.568-571, 1974.

- 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.
- 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.**, Washington, v.57, p.2318-2323,
1989.
- NI, H., KNIGHT, A. I., CARTWRIGHT, K. A., V., McFADDEN, J. J.
Phylogenetic and epidemiological analysis of *Neisseria meningitidis*
using probes. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.109, p.227-239, 1992.
- PEETERS, C. C., RUMKE, H. C., SUNDERMANN, L. C., van der VOORT,
R., MEULENBELT, J., SCHULLER, M., KUIPERS, A. J., van der Ley,
P., POOLMAN, J. T. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA
containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. **VACCINE**,
London, v.14, p.1009-1015, 1996.
- PELTOLA, H. et al. Shift in the age-distribution of meningococcal disease
as predictor of an epidemic? **Lancet**, London, v.2, p.595-597, 1982.
- PELTOLA, H. Meningococcal disease: still with us. **Rev. Infect. Dis.**,
Chicago, v.5, p.71-91, 1984.
- POOLMAN, J. T. & BUCHANAN, T. M. Monoclonal antibodies against
meningococcal outer membrane proteins. **Med. Trop.**, Marseille, v. 43,
p.139-142, 1983.

POOLMAN, J. T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect. Agents Dis.**, New York, v. 4, p.13-27, 1995.

RIOU, J. Y., SALIOU, P., GUIBOURDENCHE, M., CHALVIGNAC, M. A. Etude bactériologique et sérologique de 358 souches de *Neisseria* et *Branhamella* isolées em Haute-Volta. **Méd. Maladie Infec.**, Paris, v.10, p.430-439, 1980.

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

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.**, Washington, v.30, p.1734-1738, 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.**, Washington, 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.**, Washington, 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.**, Washington, 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.**, Washington, 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**, São Paulo, v.40, p.65-70, 1998c.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual.** , New York., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

SAUKKONEN, K., ABDILLAHI, H., POOLMAN, J. T., and LEINONEM, M., Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. **Microb. Pathog.**, London, v.3, p. 261-267, 1987.

SCHOLTEN, R. J. P. M., BILJMER, H. A., POOLMAN, J. T., KUIPERS, A. J., CAUGANT, D. A., van-ALPHEN, L., DANKERT, J., VALKENBURFG, H. A. Meningococcal disease in Netherlands, 1958-1990: steady increase of the incidence rate since 1982 partially caused by new serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.16, p.237-246, 1993.

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.**, Edinburgh, v.41, p.236-243, 1994.

SIERRA, V. G. G., CAMPA, C. H., GARCIA, L. I. SOTOLONGO, F. P., IZQUIERDO, L. P., VALCARCEL, M. N., CASANUEVA, V. G., BARO, M. S., LEGUEN, F. C., RODRIGUES, R. C., TERRY, H. M. Efficacy evaluation of the cuban vaccine VA-MENGOC-BC® against disease caused by serogroup B *Neisseria meningitidis*. In: **Neisseria 90**. ACHTMAN, M., KOHL, P., MARCHAL, C., MORELLI, G., SEILER, A., THIESEN, B. eds. Berlin, Walter de Gruyter, p.129-134, 1990.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, London, v.98, p. 503-7, 1975.

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.**, Oxford, 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.**, Reading, v.142, p.63-69, 1996.
- 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.**, Washington, v.34, p.1468-1473, 1996.
- 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.**, Washington, v.58, p.1355-1359, 1990.
- TONDELLA, M. L. C., SACCHI, C. T., NEVES, B. C. Ribotyping as an additional molecular marker for studying *Neisseria meningitidis* serogroup B epidemic strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p.2745-2748, 1994.
- TSAI, C. M., FRASCH, C. E., MOCCA, L. F. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. **J. Bacteriol.**, Baltimore, 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.**, Washington, v.55, p.1652-1656, 1987.

- URWIN, R., FEAVERS, I. M., JONES, D. M., MAIDEN, M. C. J., FOX, J. Molecular variation of meningococcal serotype 4 antigen genes. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.121, p.95-101, 1998.
- 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.**, Washington, v.61, p.4217-4224, 1991.
- VEDROS, N.A. Genus 1 - *Neisseria*. In: KRIEG, N. R., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. v.1, p.290-296.
- VERDU, M. E., COLL, P. FONTANALS, D., MARCH, F., PONS, I., ESSO, D., PRATS, G. Comparison of conventional ribotyping and PCR-RFLP ribotyping for the analysis of endemic strains of *Neisseria meningitidis* isolated in a local community over 7 years. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.179, p.247-253, 1999.
- 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.**, Oxford, v.6, p.2785-2795, 1992.
- VIRJI, M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. **TRENDS MICROBIOL.**, Cambridge, v.4, p. 466-470, 1996.
- 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.**, Amsterdam, v.94, p.283-290, 1992.

- 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.**, Edinburgh, v.31, p.195-201, 1990.
- 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.**, Washington, v.58, p.569-572, 1990.
- WOODS, T. C., HELSEL, L. O., SWAMINATHAN, B., BIBB, W. F., PINNER, R. W., GELLIN, B., G., COLLIN, S., F., WATERMAN, S. H., REEVES, M. W., BRENNER, D. J., BROOME, C. V. Characterization of *Neisseria meningitidis* serogroup C by multilocus enzyme electrophoresis and ribosomal DNA restriction profiles (ribotyping). **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, p.132-137, 1992.
- YAKUBU, D. E. & PENNINGTON, T. H. Epidemiological evaluation of *Neisseria meningitidis* serogroup B by pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, Amsterdam, 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.**, Edinburgh, v.48, p.1055-1064, 1999.
- 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.**, Oxford, 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.**, Washington, 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.**, New York, 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.**, Washington, 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, 1990. P.325-347.

10.0. ANEXOS

Apresentação em Reuniões Científicas

1. Eleventh International Pathogenic Neisseria Conference

Nice, França, 1 a 6 de novembro de 1998

“Genetic relationships among serogroup B: serotype 4 *Neisseria meningitidis* strains”.

2. III Encontro do Instituto Adolfo Lutz

São Paulo, 18 a 21 de outubro de 1999

“Genetic relationships among serogroup B: serotype 4 *Neisseria meningitidis* strains from Brazil”

3. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia

Salvador, Bahia, 24 a 28 de outubro de 1999

“Caracterização molecular das proteínas das classes 1, 2, 3 e 5 da *Neisseria meningitidis*” (mesa-redonda)