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

**Resposta imune humoral de pacientes com
doença meningocócica frente a lipooligossacarídeos
específicos**

Carin Gorescu Caldeira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Carmo Elias Andrade Melles

São Paulo
2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Caldeira, Carin Gorescu

Resposta imune humoral de pacientes com doença meningocócica frente a lipooligossacarídeos específicos/ Carin Gorescu Caldeira. São Paulo: 2004. 64 f.:il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carmo Elias Andrade Melles.

1. Lipopolissacarídeo 2. Neisseria meningitidis 3. Formação de anticorpos

NLMC – QU83

Carin Gorescu Caldeira

**Resposta imune humoral de pacientes com
doença meningocócica frente a lipooligossacarídeos
específicos**

COMISSÃO JULGADORA

da

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof. Dr. Carmo Elias de Andrade Melles
Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cobo Zanella Ramos
1º Examinador

Prof^a. Dr^a. Adelaide José Vaz
2º Examinador

São Paulo, 06 de abril de 2004.

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Bactérias
Piogênicas e Toxigênicas na Seção de Bacteriologia do Instituto
Adolfo Lutz Central.

“A Felicidade murcha como as flores, porém, assim como o bom jardineiro tem sempre a seu alcance outras para substituí-las, quem possui conhecimentos pode também substituir constantemente os motivos que dão permanência à felicidade na vida. O conhecimento fixa-a, torna-a estável; permite sentir seu palpitar de eternidade”

(Raumsol)

Dedico este trabalho à minha mãe Rosa, que se constitui um permanente incentivo; ao meu marido Marcio e aos meus filhos Ariel e Tomas pela paciência e colaboração.

AGRADECIMENTOS

A todos os dirigentes do Instituto Adolfo Lutz, em especial aos diretores da Divisão de Biologia Médica, que me permitiram desenvolver esse trabalho na Seção de Bacteriologia.

Aos membros titulares da Banca examinadora da Qualificação da dissertação, Dr. Carmo Elias Andrade Melles, Dr^a. Adelaide José Vaz, Dr^a. Rosemeire Cobo Zanella Ramos e aos membros suplentes, Dr^a. Maria Cristina Cunto Brandileone, Dr^a. Elsa Masae Mamizuka e Dr. David Eduardo Barroso pelos comentários, correções e valiosas sugestões.

Às equipes das Secretarias e às Comissões do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela amizade e dedicação.

À Dr^a. Angela Brandão e Dr^a. Maria Cecília Outeiro Gorla pela contribuição em minha formação científica e pelas sugestões dadas a esse trabalho.

À Dr^a. Vera Simonsen e Dr^a. Ana Paula Silva Lemos pelas sugestões dadas a esse trabalho.

Ao Dr. David Eduardo Barroso pelas orientações e fornecimento das amostras clínicas.

Ao Dr. Chao Ming Tsai pelo fornecimento do LOS purificado.

*Ao Dr. Wendell Zollinger, pela tipagem do LOS das cepas de *Neisseria meningitidis*.*

A todos os colegas da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O MENINGOCOCO	2
1.2. EPIDEMIOLOGIA	5
1.3. FISIOPATOLOGIA	6
1.4. FATORES DE VIRULÊNCIA	10
1.5. ESTRUTURA E BIOSÍNTESE DE LOS	13
1.6. SIALILAÇÃO TERMINAL DE LOS	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. LOCAL E TIPO DE ESTUDO	21
3.2. POPULAÇÃO E DEFINIÇÃO DE GRUPOS	22
3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS	23
3.4. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO LOS	25
3.5. DOSAGEM DE ANTICORPOS CONTRA LOS	26
3.6. ENSAIO DE ELISA POR INIBIÇÃO	28
4. RESULTADOS	31
4.1. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS	31
4.2. IMUNOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE <i>Neisseria meningitidis</i>	32
4.3. ESTABELECIMENTO DE SORO PADRÃO E CURVA DE CALIBRAÇÃO	33
4.4. ELISA PARA ANTICORPOS ANTI-LOS	36
4.5. ELISA DE INIBIÇÃO	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	48
7. ANEXOS	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO CORE INTERNO DO LOS. P.13

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO LPS COM AS RESPECTIVAS CADEIAS α , β E γ , E GENES ASSOCIADOS À TRANSFERÊNCIA DOS RESÍDUOS DE AÇÚCARES. P.16

FIGURA 3. CINÉTICA DOS ANTICORPOS IgG ANTI-LOS DE *Neisseria meningitidis* EM SOROS DE PACIENTES DOS GRUPOS I E II - FASE AGUDA E CONVALESCENTE. P.38

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA INTERAÇÃO LOS-IgG PELA PRESENÇA DOS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS (L1 AO L10) E HETERÓLOGOS. P.41

GRÁFICO 1. CURVAS OBTIDAS PELA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA CADA UM DOS ANTÍGENOS NO SORO DE REFERÊNCIA (S2337). P.34

GRÁFICO 2. REGRESSÃO LINEAR – CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS NO SORO DE REFERÊNCIA E VALORES DE ABSORBÂNCIA. P.34

GRÁFICO 3. MÉDIA DE ANTICORPOS IgG CONTRA L3,7 E L3,7S. GRUPO I – FASE CONVALESCENTE. P.39

GRÁFICO 4. INIBIÇÃO DA REAÇÃO LOS-IgG EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{ML}$) DE ANTÍGENOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS EM SOLUÇÃO. P.40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RESUMO DAS ESTRUTURAS JÁ DETERMINADAS DOS IMUNOTIPOS DE LOS P.14

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS NOS GRUPOS I, II, III. P.31

TABELA 3. RELAÇÃO ENTRE SOROGRUPOS E IMUNOTIPOS EXPRESSOS PELOS ISOLADOS DE *Neisseria meningitidis* EM PACIENTES DO GRUPO I. P.32

TABELA 4. VALORES DE r^2 E p . CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS NO SORO DE REFERÊNCIA E ABSORBÂNCIAS P.33

TABELA 5. FASE AGUDA. MÉDIA DAS CONCENTRAÇÕES DE IgG DOS SOROS COLHIDOS DOS GRUPOS I, II E III. ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA). P.36

TABELA 6. FASE CONVALESCENTE. MÉDIA GEOMÉTRICA (LOG) DAS CONCENTRAÇÕES DE IgG DOS SOROS DOS PACIENTES DOS GRUPOS I E II. ANÁLISE DA VARIÂNCIA. P.37

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AB	Albumina bovina
ANOVA	Análise de Variância
CD	“Cluster of differentiation”
CMP-NANA	“Monophosphate cytosine – <i>N</i> -acethyl neuraminic acid”
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
Gal	Galactose
GlcNac	<i>N</i> -acetil glicosamina
Glic	Glicose
Hep	Heptose
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KDO	Ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico
L	Litro
LCE	Líquido cérebro-espinhal
Lgt	LOS glicosil transferase
LNnT	Lacto- <i>N</i> -neotetraose
LOS	Lipooligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MBL	“Manose binding lectin”
min	Minuto
mL	Mililitro
NANA	“ <i>N</i> -acethyl neuraminic acid”
N-CAM	“Neural-cell adesion molecule”
NE	Não Esclarecida
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
Opa	“Opacity associated protein”
Opc	“Outer membrane protein class 5 precursor”
PE	“Phosphoetanolamine”
PME	Proteína de membrana externa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade
VME	Vesícula de membrana externa
VR	“Variable region”

RESUMO

A meningite meningocócica permanece como importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Extratos purificados de LOS de *Neisseria meningitidis* foram utilizados em um ensaio de ELISA a fim de detectar a especificidade dos anticorpos anti-LOS produzidos por 41 pacientes com doença meningocócica. Durante o período de convalescença, 100% dos pacientes apresentaram aumento da concentração sérica de IgG anti-LOS (L1, L2, L3,7, L6, L8 e L10) em no mínimo três vezes a concentração verificada nos soros coletados durante a fase aguda. O maior aumento foi de oito vezes para IgG anti-L3,7 adicionada de resíduo de ácido siálico. Portadores de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactâmica* na nasofaringe não produziram anticorpos anti-LOS. Através de um ensaio ELISA de Inibição, foi possível verificar a especificidade dos anticorpos anti-LOS, exceto para os anticorpos IgG anti-L10, que apresentaram reação cruzada com outros tipos antigênicos de LOS como L2, L3,7 e L6, revelando-se um importante candidato a antígeno vacinal.

ABSTRACT

Meningococcal meningitis remains as an important cause of morbidity and mortality all over the world. Purified LOS extracts were used in an ELISA assay to verify the specificity of the antibodies produced due to meningococcal disease. All 41 convalescent sera collected from patients had at lowest a three-fold increase of anti-LOS IgG concentrations when compared with acute sera. A higher increase of eight fold was seen to anti-L3,7 IgG specific antibodies. Safe carries of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* had no detectable specific anti-LOS antibodies. In an Inhibition ELISA assay, except for anti-L10 IgG, antibodies against L1, L2, L3,7, L6 and L8 immunotypes were specific. Anti-L10 antibodies cross-reacted with L2, L3,7 and L6 epitopes.

1. INTRODUÇÃO

A doença meningocócica, causada pela *Neisseria meningitidis* (meningococo), ocorre de forma endêmica no mundo, o que a torna um importante problema de Saúde Pública (ANDERSEN et al., 2002). Atinge países da América do Sul, costa noroeste do Estados Unidos, costa ocidental da Europa, Nova Zelândia, Austrália, Noruega, China, Canadá, Reino Unido (RAM et al., 1999) e principalmente uma região sub-Saara, denominada Cinturão Africano, onde ocorreram mais de 360.000 casos entre 1996 e 1999, com uma mortalidade de 5 a 15% (WHO, 2003). Além da importante taxa de mortalidade associada à doença, após a cura, 10 a 20% dos pacientes permanecem com seqüelas graves como perda de audição, distúrbios da fala, retardo mental, paralisia ou necessitam amputação de membros (TZENG et al., 2000; WHO, 2003).

Nos países desenvolvidos a incidência varia de 1 a 3 casos por cem mil habitantes por ano, podendo alcançar coeficientes que variam de 10 a 50 casos por cem mil habitantes durante os surtos epidêmicos (BASH et al., 1995).

No Brasil ocorreram cerca de 60.000 casos entre 1991 e 2001; somente em 2001, foram registrados 2.867 casos, com uma taxa de mortalidade de cerca de 19%. (FUNASA, 2004; POLLARD et al., 2001).

1.1. O Meningococo

Neisseria meningitidis é um diplococo Gram-negativo, pertencente à família *Neisseriaceae*, que coloniza a membrana mucosa da nasofaringe de 5 a 10% da população, sendo este seu único *habitat* natural (PLESTED et al., 1999). Os portadores são os principais responsáveis pela transmissão da bactéria, que se dá pela emissão de aerossóis e perdigotos contaminados (WHO, 2003). Assim como outras bactérias Gram-negativas, o meningococo apresenta em sua estrutura uma membrana externa composta por lipídios, proteínas de membrana externa (PMEs) e lipopolissacarídeos (LPS). O LPS do meningococo, também designado lipooligossacarídeo (LOS) é uma endotoxina estruturalmente distinta daquela presente em outras bactérias Gram-negativas, pois não contém o antígeno O, e sua cadeia oligossacarídica contém apenas cinco a dez resíduos ligados ao lipídio A (TSAI et al., 2002).

As cepas patogênicas de meningococo são envolvidas por uma cápsula polissacarídica aderida à membrana externa (POLLARD et al., 2001).

O meningococo apresenta grande diversidade genética, que pode ser parcialmente explicada por recombinação intra-específica ou ainda entre espécies diferentes de neisserias (ROSENSTEIN et al., 2001)

De acordo com as diferenças antigênicas dos polissacarídeos capsulares a *Neisseria meningitidis* pode ser classificada em sorogrupos. A diferenciação entre os sorogrupos pode ser feita através de técnicas imunológicas simples como a soro-aglutinação, usando anticorpos mono e policlonais (BARROSO, 2001). Os sorogrupos são designados por letras maiúsculas: A, B, C, D, 29E, H, I, J, K, L, W135, X, Y e Z, (MORLEY, 2002) sendo os sorogrupos A, B, C, W135 e Y responsáveis pela maioria dos casos de doença meningocócica em todo o mundo (RAM et al., 1999; VOGEL et al., 1999).

As cápsulas expressas pelos sorogrupos B, C, Y e W-135 são compostas por polímeros do ácido siálico (ácido *N*-acetil neuramínico,

NANA) puro, ou ligado a glicose ou galactose. A cápsula do meningococo B, composta por unidades repetidas do ($\alpha 2 \rightarrow 8$) ácido *N*-acetil neuramínico, é pouco imunogênica pois apresenta semelhança estrutural com moléculas do hospedeiro, como a molécula de adesão da célula neural (N-CAM). No entanto, o polissacarídeo C, composto por unidades repetidas do ($\alpha 2 \rightarrow 9$) ácido *N*-acetil-neuramínico é imunogênico e estimula a produção de anticorpos protetores (De VOE, 1982). A cápsula do polissacarídeo A é composta por polímeros de *N*-acetil-manosamina. (SWARTLEY, 1997, ROSENSTEIN, 2001)

Na membrana externa do meningococo estão presentes cinco classes de proteínas designadas proteínas de classe 1, 2, 3, 4 e 5. As proteínas de classes 2 ou 3 são utilizadas para a determinação dos sorotipos de *Neisseria meningitidis* e apresentam função de porinas (PorB2 e PorB3). As PorB2 e PorB3 apresentam quatro regiões estruturais de grande variabilidade (VR1, VR2, VR3 e VR4) e sua expressão é mutuamente excludente, pois os dois alelos estão localizados no mesmo gene (RAM et al., 1999, FEAVERS et al., 1992).

As proteínas de membrana externa de classe 1 (também porinas, PorA) permitem a classificação de *Neisseria meningitidis* em soro-subtipos, de acordo com diversidade dos epítomos expressos nas duas regiões variáveis VR1 e VR2 (ZAPATA et al., 1992).

As proteínas de classe 5, conhecidas como proteínas de opacidade (Opa e Opc) também são altamente variáveis e estão relacionadas com a adesão do meningococo às células epiteliais e leucócitos (ZAPATA et al., 1992).

As proteínas de classe 4 são altamente conservadas e por este motivo não são utilizadas como marcadores epidemiológicos do meningococo.

Os sorotipos e soro-subtipos podem ser determinados através de técnicas imunológicas utilizando anticorpos monoclonais, ou ainda por técnicas moleculares. (FEAVERS et al., 1992; ZAPATA et al., 1992).

A caracterização de uma cepa também pode ser feita de acordo com os imunotipos de seu LOS, componente da membrana externa e principal fator de virulência (JENNINGS et al., 1995). A molécula de LOS é anfipática e constituída pelo lipídio A, presente e conservado em todas as bactérias Gram-negativas, que ancora o LOS na membrana externa e é responsável por desencadear o choque séptico quando liberado na corrente circulatória.

Durante a multiplicação e na lise do meningococo, a endotoxina é liberada na forma de vesículas de membrana externa (VMEs) que contém em sua composição 25 a 50% de lipooligossacarídeos, além de proteínas de membrana externa, lipídeos e polissacarídeos (ALBIGER et al., 2003). Nas infecções por *Neisseria meningitidis*, o LOS está relacionado com a evasão do sistema imune, adesão ao tecido epitelial, invasão das células do hospedeiro, mediação de lesão tóxica e produção de anticorpos bactericidas (ALBIGER et al., 2003, ARKING et al., 2001). Os epítomos de LOS são imunogênicos em crianças e induzem anticorpos bactericidas protetores, direcionados para a região conservada e de baixo peso molecular do LOS (ANDERSEN et al., 2002; DRABICK et al., 1999).

Os imunotipos são determinados fenotipicamente pelas diferenças antigênicas nas cadeias laterais da molécula do lipooligossacarídeo e são designados pela letra L seguida dos algarismos 1 até 12 (SCHOLTEN et al., 1994).

1.2. Epidemiologia

A doença meningocócica ocorre de forma endêmica e epidêmica em todo o mundo, mas a prevalência dos tipos sorológicos de *Neisseria meningitidis* difere geograficamente. Entre os sorogrupos, cinco são responsáveis pela maioria dos casos de doença no mundo. O sorogrupo A está mais relacionado com as epidemias que ocorrem na África, os sorogrupos B e C, são os mais isolados nos países desenvolvidos e no Brasil, correspondem a 60 e 40% dos casos, respectivamente (SACCHI et al., 2001).

Os grupos W135 e Y são mais raros e estão relacionados com surtos esporádicos. No entanto, as epidemias causadas por cepas pertencentes ao sorogrupo W135 têm aumentado a cada ano. Dados da Organização Mundial de Saúde revelam que durante o ano de 2002 ocorreram cerca de 13.000 casos de doença meningocócica (1.500 óbitos) por cepas pertencentes a este sorogrupo em Burkina Faso, na África. Entre janeiro de 2003 e abril do mesmo ano, haviam ocorrido 7.143 casos dos quais 1.058 (15%) pacientes foram a óbito. No Reino Unido, onde o isolamento deste sorogrupo era raro, o número de casos tem alcançado 100 por ano (WHO., 2003)

É importante notar que cerca de 90% das cepas isoladas de portadores não são consideradas patogênicas pois não estão relacionadas com os clones normalmente isolados de pacientes com doença invasiva (Van DEUREN et al., 2000). A proporção de portadores em uma população varia em função da idade e da classe sócio-econômica, sendo maior em locais de agrupamento populacional, o que pode ser observado em acampamentos militares, prisões e creches.

1.3. Fisiopatologia

Os sintomas da doença meningocócica podem variar desde uma leve dor de garganta até a meningococemia aguda e choque séptico, resultado direto da hiper-estimulação de macrófagos e produção de uma grande diversidade de citocinas, incluindo as quimiotáticas para outros leucócitos, levando à hipotensão, falência de órgãos e morte. Além disso, a diferença nas apresentações clínicas também está relacionada a parâmetros como o grau de bacteremia e as concentrações sanguíneas de endotoxina e citocinas, que por sua vez estão relacionados com a patogenicidade da cepa infectante (ALBIGER et al., 2003).

A doença meningocócica pode ser classificada em quatro grupos, com base na seqüência de eventos fisio-patológicos: (i) bacteremia sem choque, (ii) bacteremia com choque e sem meningite, (iii) meningite e choque, (iiii) apenas meningite (Van DEUREN, 2000). Segundo os autores, esta classificação é fundamental para auxiliar nas decisões clínicas e adoção da terapia de suporte.

Na forma mais benigna da doença, ocorre uma meningococemia transitória com “clearance” espontâneo. A sintomatologia é similar à da gripe, com episódios de febre baixa e dores pelo corpo.

Na doença invasiva, as vesículas de membrana externa podem ser visualizadas no plasma ou líquido cérebro espinhal (LCE) através de microscopia eletrônica e sua presença está relacionada com a gravidade da doença (STEPHENS et al 1982)

Na fase bacterêmica os principais sintomas são calafrios, febre aguda e dores musculares. Em poucas horas, a infecção pode evoluir para *sepsis* meningocócica fulminante, sem infecção das meninges.

Quando a proliferação bacteriana e a concentração de citocinas no sangue são pequenas, após um período de 18 a 36 horas, o meningococo pode invadir as meninges e o paciente desenvolver o quadro de meningite. Neste caso, a hemocultura colhida na hospitalização geralmente é negativa

e o aumento na concentração de endotoxina e citocinas fica restrito ao espaço sub-aracnoidal (Van DEUREN et al., 2000)

Apesar da gravidade da doença meningocócica, sua ocorrência pode ser considerada relativamente rara diante da constatação que 3 a 40% dos indivíduos sadios são colonizados, em algum momento, por *Neisseria meningitidis* (ESTABROOK et al., 1997). O baixo índice de infectividade está relacionado com a presença, no soro da população normal, de anticorpos bactericidas e opsonizantes, capazes de conferir proteção. KAHLER e MARTIN (1998) detectaram a presença de anticorpos bactericidas contra o “core” interno do LOS no soro de indivíduos normais, portadores e pacientes convalescentes.

A defesa contra a doença meningocócica pelo hospedeiro varia com a idade do paciente, seu estado imunológico e envolve mecanismos inatos e adquiridos, através do reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, de estruturas presentes na superfície do meningococo. POLLARD e FRASCH (2001) verificaram que a atividade bactericida do soro de crianças normais é menor do que a verificada no soro de adultos normais, e que alguns indivíduos, por fatores intrínsecos, são mais susceptíveis à invasão e conseqüentemente à doença meningocócica.

O papel dos anticorpos já havia sido demonstrado pela eficácia da soro-terapia, antes ainda do uso de antibióticos. Em indivíduos normais, a incidência da doença está inversamente relacionada ao título de anticorpos específicos em seus soros (Van DEUREN et al., 2000). As recentes vacinas desenvolvidas e utilizadas para a imunização da população em diferentes países também têm revelado a importância dos anticorpos na proteção dos indivíduos contra a doença meningocócica.

Entre os principais mecanismos de proteção à invasão por *Neisseria meningitidis* está a ativação da cascata de proteínas do sistema complemento, que resulta na lise bacteriana. No caso de *Neisseria meningitidis*, esta ativação pode ser mediada por açúcares (manose, via das lectinas) e glicolipídeos (via alternativa) e, na presença de anticorpos bactericidas circulantes, a via clássica pode ser ativada. KAHLER et al.

(1998) demonstraram que a ausência de anticorpos bactericidas contra o meningococo, deficiências na cascata do complemento (principalmente C3) e a presença de IgA bloqueadora são fatores do hospedeiro que alteram a atividade bactericida do soro “*in vitro*” e por este motivo estão relacionados com um aumento do risco de desenvolver doença invasiva.

A produção de anticorpos específicos é induzida pela colonização (Van DEUREN et al., 2000) repetida, continuada ou intermitente por diferentes espécies de neisserias, como a *Neisseria lactamica*. Algumas bactérias saprófitas como o *Bacillus pumilus* e *Escherichia coli* k1 têm o polissacarídeo idêntico, do ponto de vista estrutural e imunológico, ao da *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A e do sorogrupo B, respectivamente. A colonização por estas bactérias pode favorecer a produção de anticorpos de reação cruzada, mas por outro lado, pode favorecer o aparecimento no soro, de IgAs específicas, que não fixam os componentes do sistema complemento e ainda podem bloquear a ligação de outras classes de imunoglobulinas (IgG e IgM) ao meningococo, capazes de mediar a lise por complemento, aumentando a susceptibilidade à infecção. Portanto, o papel da colonização por cepas heterólogas na produção de anticorpos protetores ainda não está bem definido (ROSENSTEIN et al., 2001; Van DEUREN et al., 2000).

A incidência da doença meningocócica está relacionada com a faixa etária: ela ocorre principalmente em crianças de 6 a 24 meses (POLLARD e FRASCH, 2001), o que coincide com a idade de menor cobertura por anticorpos protetores. Cerca de 50% dos recém nascidos (até seis meses) têm atividade bactericida no soro como consequência da presença de anticorpos maternos. Esta imunidade decai rapidamente, e entre seis e doze meses, a susceptibilidade à infecção é máxima. A partir dos dois anos, a imunidade vai aumentando gradualmente, variando de 50 a 80% aos doze anos de idade e atingindo o máximo (65-85%) na fase adulta. Em períodos epidêmicos, observa-se um deslocamento da faixa etária atingida, com um aumento de número de casos em adolescentes e adultos jovens (TZENG e STEPHENS, 2000).

Pacientes com transtornos imunológicos como deficiência de properdina ligada ao sexo e deficiência da lectina ligadora de manose (MBL), têm a susceptibilidade à infecção aumentada. Neles, a mortalidade associada à doença é maior que 50% e a recorrência é rara nos sobreviventes. Van DEUREN (2000) e POLLARD (2001) em seus estudos concluíram que pacientes com deficiência nos componentes terminais da cascata do sistema complemento (C5-C9) vão ter doença meningocócica e metade deles estarão sujeitos a ataques recorrentes. Neste grupo específico de pacientes, as infecções costumam ocorrer por sorogrupos não comumente relacionados com a doença na população normal, e com padrões clínicos menos severos.

1.4. Fatores de Virulência

Uma vez que a *Neisseria meningitidis* é geralmente encontrada colonizando e não invadindo tecidos, os fatores de virulência como as fímbrias (pili), os polissacarídeos capsulares, as proteínas de membrana externa e ainda os lipopolissacarídeos das cepas invasivas têm sido amplamente estudados.

O primeiro passo essencial para o desenvolvimento de doença causada pelas *Neisseria meningitidis* patogênicas é a adesão da bactéria às microvilosidades das células colunares não ciliadas da mucosa da nasofaringe (ALBINGER et al., 2003). A colonização das células alvo ocorre em duas etapas: adesão inicial mediada pelo pili tipo IV, a principal adesina, que se liga ao receptor CD46 na membrana celular, seguido do contato íntimo entre os componentes da membrana bacteriana. As proteínas de opacidade Opa ligam-se ao CD66, enquanto que as Opc ligam-se aos receptores de heparan-sulfato. A ligação estimula a endocitose do meningococo pelas células epiteliais e a formação de um vacúolo fagocítico. A sobrevivência do meningococo na célula epitelial é favorecida pela presença da protease IgA1 e das porB, e quando isso ocorre, ele atravessa a célula epitelial e atinge a corrente sangüínea, podendo provocar doença. No entanto, para a maioria dos indivíduos, a colonização desempenha um papel protetor, uma vez que resulta na produção de anticorpos que protegem da doença (Van DEUREN et al., 2000, ROSENSTEIN et al., 2001).

ALBINGER et al (2003) demonstraram que a perda de LOS pela *Neisseria meningitidis* impede a invasão das células do hospedeiro, de modo que a cápsula, em conjunto com o LOS, o pili e ainda outras proteínas de membrana externa são os fatores de virulência necessários para que uma determinada cepa circulante possa invadir os tecidos e causar doença (ARKING et al., 2001; Van DEUREN et al., 2000).

A expressão da cápsula polissacarídica na *Neisseria meningitidis* sofre variação de fase, sendo que os isolados da nasofaringe são em geral não capsulados, o que facilita a adesão e a invasão das células epiteliais, enquanto que os isolados de sangue e LCE em doença invasiva são encapsulados (De VRIES et al., 1996; MORAN et al., 1994). Além disso, em um trabalho realizado por SWARTLEY et al (1997) com cepas isoladas de um surto que ocorreu nos Estados Unidos nos anos de 1994 e 1995, foi possível verificar que isolados isogênicos expressavam cápsulas B ou C, constatando que além de expressar ou não a cápsula, a *Neisseria meningitidis* é capaz ainda de alternar o tipo de cápsula que expressa, variando o sorogrupo capsular de B para C.

A presença de cápsula polissacarídica em uma determinada linhagem de *Neisseria meningitidis* está diretamente relacionada com seu grau de resistência ao soro humano normal. Entre os prováveis mecanismos relacionados com o aumento da resistência ao soro pelas bactérias com cápsula de ácido siálico (B e C) está a configuração espacial, que diminui a ligação de anticorpos específicos para outras estruturas da superfície do meningococo e o ácido siálico capsular que redireciona a deposição do C3 na superfície da bactéria, aumentando o C3 ligado e tornando-o mais acessível ao efeito dos fatores H e I, com subsequente bloqueio do fator B e aumento da inativação de C3b para iC3b. (MORAN et al., 1994)

Neisseria meningitidis, além de apresentar cápsula de ácido siálico, ainda é capaz de adicionar um resíduo de ácido siálico à galactose terminal do LOS, tornando-o “sialilado” (TSAI et al., 2002). Quando o meningococo expressa simultaneamente uma cápsula de ácido siálico e seu LOS “sialilado”, a soro-resistência é máxima. No entanto, segundo KAHLER et al (1998), a expressão de LOS “sialilado”, na ausência de cápsula não é suficiente para proteger a bactéria contra a lise por complemento. Estas constatações evidenciam a importância do ácido siálico como mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro e são coerentes com as observações de que a maioria dos isolados de pacientes com doença

invasiva pertencem aos imunotipos L3, L7 e L9, que podem ser “sialilados” (RAM e MACKINNON, 1999).

Além de mascarar epítomos imunogênicos, a sialilação do LOS também diminui a ligação da lectina ligadora de manose (MBL) à superfície do meningococo e a subsequente deposição do fragmento C4 da cascata do sistema complemento.

1.5. Estrutura e Biossíntese de LOS por *Neisseria meningitidis*

A estrutura do LOS tem sido estudada desde 1977 (ZOLLINGER et al) e foi determinada pela capacidade de reagir com anticorpos monoclonais, mobilidade em gel de poliacrilamida, espectrometria de massa atômica, ressonância magnética nuclear, cromatografia gás-líquido e cromatografia em camada delgada (TSAI et al., 1991; JENNINGS et al., 1995; ANDERSEN et al., 1996).

Na estrutura básica da molécula de LPS, estão presentes o lipídeo A, ancorado à membrana externa e ligado a ele, duas moléculas de ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico (KDO). A estas moléculas, são adicionadas duas moléculas de heptose, Hep-1 e a Hep-2, onde são inseridos os resíduos de açúcares responsáveis pela alongamento da cadeia α (fig. 1). O número de resíduos e o comprimento da cadeia α podem variar, e esta variação é importante para determinar o potencial patogênico de uma determinada cepa (ARKING et al., 2001).

A figura 1 mostra a imagem tridimensional do core interno do LOS, com a molécula de fosfoetanolamina (PE) ligada às posições 3 e 6 da Hep-2, originando estruturas terciárias com diferente reatividade a anticorpos monoclonais.

FIGURA 1. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO CORE INTERNO DO LOS. (a) FOSFOETANOLAMINA (PE) NA POSIÇÃO 3, (b) FOSFOETANOLAMINA NA POSIÇÃO 6 E (c) SEM FOSFOETANOLAMINA. (PLESTED, 1999)

A tabela 1 apresenta um resumo das estruturas já determinadas dos imunotipos de LOS (TSAI et al., 2002; CHARALAMBOUS et al., 1999). Os espaços assinalados por NE (não esclarecida) indicam as estruturas ainda desconhecidas.

TABELA 1. RESUMO DAS ESTRUTURAS JÁ DETERMINADAS DOS IMUNOTIPOS DE LOS

<i>Imunotipo</i>	<i>Adição de ácido siálico</i>	<i>Cadeia α (ligação à hep 1)</i>	<i>Cadeia β (ligação à hep 2)</i>	<i>Cadeia γ (ligação à hep 2)</i>
<i>L 1</i>	Sim	Gal –Gal–Glic	PEt (3)	GlcNac (2)
<i>L 2</i>	Sim	Gal –GlcNAc–Gal-Glic	PEt (6,7) Glic (3)	GlcNac (2)
<i>L 3</i>	Sim	Gal –GlcNAc–Gal-Glic	PEt (3)	GlcNac (2)
<i>L 4</i>	Sim	Gal –GlcNAc–Gal-Glic	PEt (6,7)	GlcNac (2)
<i>L 5</i>	Sim	Gal –GlcNAc–Gal-Glic-Glic	Glic (3)	GlcNac (2)
<i>L 6</i>	Não	GlcNAc-Gal-Glic	PEt (6,7)	GlcNac (2)
<i>L 7</i>	Sim	Gal –GlcNAc–Gal-Glic	PEt (3)	GlcNac (2)
<i>L 8</i>	Não	Gal–Glic	PEt (3)	GlcNac (2)
<i>L 9</i>	Sim	Gal –GlcNAc–Gal-Glic	PEt (3)	GlcNac (2)
<i>L 10</i>	Sim	Gal-Glic-Glic	NE	NE
<i>L 11</i>	NE	NE	NE	NE
<i>L 12</i>	NE	NE	NE	NE

Apesar da composição das cadeias laterais de L11 e L12 ainda não ter sido esclarecida, a expressão destes imunotipos é mais freqüentemente observada em isolados do sorogrupo A (CHARALAMBOUS et al., 1999; TSAI et al., 2002).

A composição de açúcares da estrutura do LOS depende também da composição do meio de cultura onde o meningococo está crescendo. TSAI et al (1991) verificaram que cepas originalmente pertencentes aos imunotipos L6, L11 e L12 tornaram-se indistintas em gel de poliacrilamida após o crescimento em meio Catlin e tripticase soja. Os mesmos autores, utilizando uma técnica de “Dot Blotting” com monoclonal específico para o grupo lacto-*N*-neotetraose (LNnT), verificaram que este grupo, que contém a seqüência terminal de açúcares galactose, N-acetil-glucosamina e galactose, está presente em 8 imunotipos de LOS, com forte reação nos imunotipos L2, L3, L4, L5, L7, L8 e L9. A reação verificada foi moderada contra os imunotipos L5 e L10 e não reagente para os imunotipos L1, L6, L11 e L12.

Apesar dos esforços empregados até o momento, as estruturas de todos os imunotipos de LOS não estão totalmente esclarecidas. No entanto, alguns genes responsáveis pela adição de resíduos de açúcares à porção lipídica já estão bem caracterizados. O gene *rfaC* codifica a enzima responsável pela adição da primeira heptose (Hep-1) à molécula de KDO, enquanto o *rfaF*, para a adição da segunda heptose, à Hep-1. Outra família de genes, responsáveis pela síntese das enzimas LOS glicosil transferases (*lgt*), são responsáveis pelo alongamento da cadeia α , através da adição de resíduos de açúcares. O gene *lgtF* é o responsável pela adição da primeira glicose à cadeia α . Cada um dos genes *lgt* adiciona um açúcar diferente à sua respectiva posição, conforme representado na figura 2 (PLESTED et al., 1999; TSANG et al., 2001).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO LPS COM AS RESPECTIVAS CADEIAS α , β E γ , E GENES ASSOCIADOS À TRANSFERÊNCIA DOS RESÍDUOS DE AÇÚCARES (adaptado de ZHU et al., 2002).

JENNINGS et al (1995, 1999) verificaram que a expressão de LOS de *Neisseria meningitidis* é sujeita à variação de fase e alta frequência de mutações, de modo que uma cepa, em momentos diferentes e dependendo das condições de crescimento e do próprio hospedeiro, pode expressar diferentes estruturas fenotípicas. O mecanismo molecular associado a esta variação está relacionado com a presença de três *loci* hipermutáveis (figura 2, chaves *lgt-1*, *lgt-2* e *lgt-3*) que contém as seqüências de leitura das várias glicosil-transferases, seguidas por seqüências homopoliméricas com números de bases de citosina e guanina que podem variar. A alteração no número destas bases pode levar à ativação ou inativação do gene por troca de fase de leitura. (PLESTED et al., 1999; ZHU et al., 2002)

Como a expressão de LOS está sujeita à variação de fase, assim como a de outros importantes antígenos, recentemente ZHU et al. (2002) estabeleceram uma classificação para o gênero *Neisseria* segundo 10 genótipos diferentes de LOS. Estes genótipos (1 a 10) distinguem o potencial genético de variação do LOS de acordo com a organização dos três diferentes *loci* (*lgt1*, *lgt2*, *lgt3*) que contém as seqüências de leitura que codificam as enzimas *Lgt*. Os *loci* 1 e 3 são hipervariáveis, enquanto que o *locus* 2 é constante entre as espécies de neisserias.

1.6. Sialilação Terminal de LOS

A estrutura do LOS do meningococo pode ainda ser modificada pela adição de um resíduo de ácido siálico (sialilação) à galactose terminal da estrutura lacto-*N*-neotetraose, que mascara o LOS, protegendo-o do sistema imunológico e torna a bactéria resistente à lise mediada por complemento: propriedade chamada de soro-resistência (ARKING et al., 2001).

A sialilação também é sujeita a variações e depende da cepa, da estrutura de LOS e das condições de crescimento. Esta reação é mediada pela presença da enzima α -2,3-sialil-transferase (Lst), codificada pelo gene LOS sialil transferase (*lst*) e depende da presença, no meio, de seu substrato: o ácido acetil neuramínico ativado (CMP-NANA), que pode ser sintetizado endogenamente ou capturado do meio (15). Além disso, é necessário que o LOS contenha a estrutura terminal lacto-*N*-neotetraose, que é o receptor para a enzima que deposita o resíduo de ácido siálico, geralmente presente no imunotipo L3,7,9 (TSANG et al., 2001; VOGEL et al., 1999). A ausência de um destes fatores inviabiliza a sialilação do LOS.

O gene *lst* é composto por aproximadamente 1113 pares de base e reside entre dois genes não relacionados com a biossíntese do LOS (TSANG et al., 2001).

A enzima Lst pode ser encontrada ancorada à membrana externa de *Neisseria lactamica* e de *Neisseria meningitidis* sorogrupo A, como uma proteína constitutiva e ativa, não regulada pela fonte de carbono do meio e não sensível à inativação por catabólitos o que possibilita a sialilação exógena do LOS, desde que na presença do substrato CMP-NANA no meio externo. Já as cepas pertencentes aos sorogrupos B, C, W135 e Y, expressam uma Lst periplasmática e sintetizam o substrato endogenamente, o que possibilita a sialilação endógena do LOS (TSANG et al., 2001, CARTWRIGHT et al., 1995). As cepas de *Neisseria meningitidis* que não tem ácido siálico como constituinte da cápsula (A, W135, Y), não sialilam LOS “*in vitro*”, apesar da presença do gene *lst*.

As cepas do imunotipo L3,7, mais isoladas de doença invasiva, sialilam endogenamente a lacto-*N*-neotetraose (LNnt), que é o precursor H dos antígenos do grupo ABO (CARTWRIGHT et al., 1995).

A expressão de L8 aumenta a sensibilidade das cepas ao soro e ao mesmo tempo a capacidade de invasão dos tecidos. Os prováveis mecanismos associados a uma maior sensibilidade são o aumento da exposição das proteínas de membrana externa à ação de anticorpos específicos e o próprio LOS funcionar como antígeno alvo para a ação de anticorpos bactericidas (MORAN et al., 1994).

Grande parte dos estudos realizados sobre a estrutura e a imunogenicidade de *Neisseria meningitidis* têm como objetivo uma maior compreensão do papel de cada estrutura na resposta imunológica à infecção e a identificação de um antígeno imunodominante, que seja conservado nas cepas circulantes e que possa ser utilizado como componente vacinal para indução de resposta protetora.

Estudos anteriores demonstraram que anticorpos contra LOS produzidos por pacientes após a doença meningocócica são bactericidas (KAHLER et al., 1998). Resta ainda verificar a especificidade destes anticorpos e se são direcionados para algum epítopo comum ou imunodominante, o que caracterizaria ainda melhor o papel do LOS na indução da imunidade para *Neisseria meningitidis*.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a resposta imune humoral de pacientes com doença meningocócica, contra os tipos sorológicos de lipooligossacarídeos de *Neisseria meningitidis* (L1, L2, L3,7, L6, L8, L10).

2.1. Objetivos Específicos

- Verificar se há correlação entre os principais sorogrupos de *Neisseria meningitidis* com os tipos de LOS identificados por imunotipagem.
- Comparar a resposta imune específica de pacientes, durante as fases aguda e convalescente, contra os imunotipos prevalentes e associados com doença meningocócica.
- Comparar a produção de anticorpos dos pacientes contra o LOS extraído de uma amostra protótipo de *Neisseria meningitidis* L3,7 (M986) sem e com ácido siálico, designada neste trabalho como L3,7**S**.
- Verificar a possibilidade de reação cruzada entre os diferentes imunotipos analisados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e Tipo de Estudo

A parte prática deste estudo foi desenvolvida no Setor de Bactérias Piogênicas e Toxigênicas da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, SP,. O material biológico foi coletado durante os anos de 1995 e 1996, no Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS), Centro Estadual de Referência para Meningites, Rio de Janeiro, R.J. O projeto original foi cadastrado no Centro de Estudos Carlos Seidl e aprovado pela respectiva Comissão de Ética. O Livre Consentimento para a coleta de material biológico foi assinado pelos pacientes ou responsáveis de pacientes menores de idade. O material biológico foi conservado no Instituto Oswaldo Cruz (FioCruz-MS, Rio de Janeiro) e posteriormente cedido ao Instituto Adolfo Lutz para as finalidades deste estudo.

Este estudo também foi cadastrado e aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz-SP e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP.

3.2. População e Definição de Grupos

As amostras de soro utilizadas neste estudo foram selecionadas de 63 pacientes de meningites bacterianas, incluídos prospectivamente, com diagnóstico confirmado por cultura e isolamento do agente etiológico.

De cada paciente foram coletadas amostras pareadas de sangue: a primeira durante a fase aguda da doença (primeiras 24 horas de internação) e a segunda, na fase convalescente, entre 15 e 30 dias (média 21 dias) após alta hospitalar. O material foi separado em alíquotas e conservado, inicialmente a -20°C e posteriormente a -70°C . Os pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo I, com doença meningocócica e Grupo II, com meningite causada por outras bactérias.

Foram utilizadas também amostras únicas de soro obtidas de indivíduos portadores (contato com pacientes e de famílias sem casos) de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica* na nasofaringe. Os portadores constituíram o Grupo III, e suas amostras foram conservadas nas mesmas condições dos Grupos I e II (TABELA 2).

3.3. Caracterização das Bactérias

3.3.1. Identificação das Espécies

As bactérias isoladas dos pacientes foram encaminhadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz – Centro Nacional de Referência para Meningites Bacterianas, SP, pelo IEISS. As bactérias foram identificadas por técnicas de coloração e provas bioquímicas clássicas conforme descrito na literatura (HOLT et al, 1994; BARROSO, 2001).

3.3.2. Identificação do Sorogrupo

A identificação dos sorogrupos de acordo com o antígeno capsular de *Neisseria meningitidis* foi confirmada na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz-SP, através da técnica de soro-aglutinação em lâmina utilizando anticorpos policlonais produzidos no próprio Instituto (POPOVIC et al, 1999).

3.3.3. Imunotipagem

A imunotipagem das amostras bacterianas foi realizada pelo Dr. Wendell Zollinger, do Laboratório de Microbiologia do Instituto Militar Walter Reed, em Washington, Estados Unidos da América. Para a determinação dos imunotipos L1; L3,7; L3,7S; L6, L8 e L10 foi utilizada a técnica de “dot blotting” com os anticorpos monoclonais 17-2-L1, 9-2-L379, 2-1-L8, 1B21B7, elaborados no próprio laboratório, conforme descrito por WEDEGE et al, 1991.

Uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 0,1 medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm foi inativada por calor (56°C/30 min) e depois utilizada para sensibilizar membranas de nitrocelulose em um ensaio “dot blotting”. As membranas (Millipore) foram secas durante 10 minutos à temperatura ambiente e usadas imediatamente ou conservadas a 4°C. As membranas foram incubadas por 30 minutos com uma solução de

bloqueio com 1% de caseína (diluída em 400mg de NaOH 0,1N adicionado à 400mL de água contendo 1,2g de Tris, 8,8g de NaCl, 1g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1g de azida sódica (InLab)– pH 7,5 – e volume completado para 1L de água) e depois lavadas uma vez com tampão fosfato (0,345g de NaH_2PO_4 , 1,406g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8,52g de NaCl – e volume completado para 1L de água). Os anticorpos monoclonais foram diluídos 10.000 vezes em solução de bloqueio e incubados por 18 horas em temperatura ambiente sob agitação constante. As membranas foram lavadas por 3 vezes com tampão fosfato e depois incubadas por 2 horas com peroxidase conjugada à imunoglobulina IgG anti-camundongo (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc) na concentração de 1mg/mL de solução de bloqueio. As membranas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato e 1 vez com Tris 50mM (pH 8,0) e reveladas com 1mg/mL de naftol AS-MX (Sigma) em 50mM de Tris (pH 8,0).

Os imunotipos L2 e L4 foram identificados através do ensaio ELISA de Inibição (modificação do radioimunoensaio de fase sólida, ZOLLINGER et al., 1977) utilizando 10 μg /mL de LOS, purificado e diluído em tampão fosfato, para sensibilizar as 96 cavidades da microplaca de poliestireno (Immulon 1[®], Dynatech) por 18 horas à temperatura ambiente. Como primeiro anticorpo, foi utilizado soro de coelho anti-LOS preparado no próprio laboratório conforme a técnica descrita por ZOLLINGER e MANDRELL (1977) utilizando as cepas protótipo 35E (L2) e 89I (L4). O soro foi diluído 100 vezes e incubado com o inibidor (100 μg /mL) por 1 hora a 37°C. Em seguida, o soro com o inibidor foi incubado na placa por 3 horas e após este período, a placa foi lavada 5 vezes utilizando tampão fosfato com 10mM de MgCl_2 . Foi adicionado à reação o anticorpo IgG anti-imunoglobulina de coelho marcado com fosfatase (Sigma) e incubado por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas por 5 vezes e em seguida foi adicionado o substrato 1mg/mL de p-nitrofenilfosfato (Sigma) em solução tampão pH 9,8 contendo 1M de Tris e 0,3mM MgCl_2 . A ligação antígeno-anticorpo foi determinada após a leitura das absorbâncias em um leitor de ELISA (MR580, Dynatech).

3.4. Extração e Purificação do LOS

As amostras de LOS foram gentilmente cedidas pelo Dr. Chao Ming Tsai, (Center for Biological Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, MD – EUA). O LOS foi extraído por gradiente fenol-água e purificado em coluna de Sepharose S-300 na presença de desoxicolato de sódio (Sigma) para remover as impurezas (de polissacarídeos capsulares ou outros), conforme descrito por GU e TSAI (1991).

Os extratos purificados foram pesados e diluídos em água destilada estéril até a concentração de 2,0 mg/mL, acrescidos de 0,02% de azida sódica (InLab) e conservadas a 4°C.

Os LOS utilizados para este estudo foram obtidos de cepas protótipo designadas entre parênteses: L1 (126E), L2 (35E), L3,7 (M986), L3,7S com ácido siálico (M986), L6 (M992), L8 (A1), L10 (7880) e ainda o LOS truncado de uma cepa mutante de M986, denominado Op-.

Nos ensaios de inibição, com a finalidade de inserir mais um controle à reação, foi utilizado um LPS heterólogo, extraído de *Salmonella enterica* (St) sorotipo Typhimurium cepa ATCC, não rugosa (Sigma L6511). Este LPS foi reconstituído com água destilada estéril até a concentração de 1,0 mg/mL, acrescido de 0,02% de azida sódica (InLab) e conservado a 4°C..

3.5. Dosagem dos Anticorpos contra LOS nos soros dos pacientes

As concentrações de IgG específicas para cada um dos imunotipos de LOS foram determinadas por ELISA, a partir de uma modificação da técnica de ROSENQVIST et al (1995), descrita a seguir.

3.5.1. Preparo das placas

Placas de microtitulação com 96 cavidades (Immulon 1, Dynatech®) foram sensibilizadas por 18 horas com 100µL de uma solução de 10µg/mL de antígeno (LOS) em tampão fosfato 0,01M, pH 7,3±1, acrescido de 0,1% de desoxicolato de sódio (Sigma®). Estas placas foram seladas e conservadas em câmara úmida a 4°C por até 10 dias após a data da sensibilização.

Para o ensaio, a solução de sensibilização foi descartada e em seguida foram adicionados em cada cavidade, 200µL de uma solução com 0,5% albumina bovina livre de imunoglobulina (Sigma®) em tampão de fosfato por 30 minutos, para bloqueio dos sítios inespecíficos. As microplacas foram então, submetidas a três lavagens consecutivas na lavadora de placas (Well Wash 3, Denley) com solução de lavagem contendo 0,01% de tween 20 (Merck®) em tampão de fosfato.

3.5.2. Diluição dos soros

Foram preparadas quatro diluições seriadas (razão 2) dos soros de fase aguda e convalescente de cada paciente e portador, partindo da diluição 1:50, usando como diluente do soro, tampão de fosfato acrescido de 0,5% de albumina bovina e 0,02% de azida sódica (InLab). Os soros foram testados em duplicata.

3.5.3. Curva padrão

Com o objetivo de obter um soro de referência a ser utilizado nas curvas de calibração do ensaio de ELISA descrito em 3.5.4, dez soros de pacientes com doença meningocócica e seis soros de indivíduos imunizados com a vacina anti-meningocócica cubana VA-MENGOC-BC® foram testados pelo mesmo método em uma etapa preliminar, até a seleção de um soro (denominado s2337) que apresentou concentração elevada de IgG contra todo o painel de LOS (L1, L2, L3,7, L6, L8, L10, Op-) e que tinha volume suficiente para a realização de todas as análises pretendidas. Ao soro s2337 foi atribuída a concentração arbitrária de 2000 U/mL de anticorpo IgG anti-L3,7.

Em todos os testes foi utilizada uma curva padrão construída usando o soro de referência na diluição inicial 1:100.

3.5.4. Teste

As placas com os soros teste e de referência foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente: após três lavagens, foram adicionados 100µL a cada cavidade, de uma solução contendo o anticorpo de carneiro anti-IgG humana, conjugado à fosfatase alcalina (Sigma®) diluído 5.000 vezes.

Após novo período de duas horas e nas mesmas condições, as placas foram submetidas a outras três lavagens com solução de lavagem e em seguida foram adicionados 100µL (por cavidade) da solução contendo 1µg de substrato p-nitrofenil fosfato dissódico (Sigma®) em 1mL de solução tampão pH 9,8 contendo 10% de dietanolamina (Merck®), 0,01% de cloreto de magnésio e 0,02% de azida sódica (InLab). Decorridos 30 minutos de reação em câmara úmida à temperatura ambiente, as placas foram lidas em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MCC/340, MK II, Labsystems) no comprimento de onda de 405 nm.

3.6. Ensaio de ELISA por Inibição

Com o objetivo de verificar a especificidade dos anticorpos contra cada um dos imunotipos, foi padronizado um ensaio imunoenzimático de inibição a partir de modificações na técnica descrita por SOININEN et al. (2000). Para este ensaio, foi preparado um “pool” utilizando volumes idênticos de soros selecionados de sete pacientes com meningite meningocócica, entre as amostras que apresentaram no ELISA anti-LOS, títulos elevados de anticorpos IgG para cada um dos imunotipos L1, L2, L3,7, L6, L8 e L10.

As microplacas Immulon I foram sensibilizadas conforme descrito no item 3.5.1.

Para a reação, 100 μ L do “pool” de soros (diluído 1:50) foram incubados por 60 minutos, sob agitação constante e à temperatura ambiente, em microtubos descartáveis (BioRad®), com 100 μ L de cada um dos antígenos (L1, L2, L3,7, L6, L8, L10) em concentrações crescentes (0 - 0,016 - 0,08 - 0,4 - 2,0 - 10,0 - 50,0 μ g/mL) e 100 μ L de LPS de *Salmonella Typhimurium* (ST) nas mesmas concentrações, como controle negativo. Simultaneamente, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos das microplacas com 200 μ L, por cavidade, de solução de fosfato adicionada de 0,5% de albumina bovina por 30 minutos. Decorrido o período de absorção dos anticorpos presentes nos soros, 100 μ L de cada tubo foram transferidos para os respectivos orifícios da placa previamente sensibilizada e lavada por 3 vezes com solução de lavagem (tampão de fosfato acrescido de 0,05% de Tween 20, Merck). Nesta etapa, o tempo de reação foi de duas horas, ao fim das quais foi realizada nova lavagem seguida da adição de 100 μ L, em cada cavidade, de solução contendo o anticorpo de carneiro anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina (Sigma®) na concentração de 1:5.000. Após duas horas de reação, as placas foram novamente lavadas três vezes com solução de lavagem e em seguida foram adicionados a cada cavidade, 100 μ L de substrato p-nitrofenil fosfato. Após 30

minutos procedeu-se à leitura das absorbâncias no leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MCC/340, MK II, Labsystems) em comprimento de onda de 405 nm. Os valores das absorbâncias foram comparados com os valores obtidos nos tubos sem antígeno, que foram considerados como 100% de reação.

3.7. Análise dos Dados

Os resultados do método de ELISA foram analisados com o auxílio do programa para microcomputadores ELISA for Windows User's Manual, version 1.00 (CDC, Atlanta - USA).

As análises de correlação utilizadas para a padronização dos ensaios foram realizadas com o auxílio do programa *Graph Pad* (Prizm).

A comparação entre os três grupos para os soros de pacientes em fase aguda e portadores, foi elaborada utilizando Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey. Para comparar os Grupos I e II entre os dois tempos (aguda e convalescente), foi utilizada ANOVA para medidas repetidas.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição das amostras

As amostras de soro utilizadas neste estudo foram selecionadas de pacientes de meningites bacterianas, com diagnóstico confirmado por cultura e isolamento do agente etiológico em 58 (92%) amostras de líquido cérebro-espinhal e 5 (8%) amostras de sangue.

Entre os 41 pacientes do Grupo I, foram isoladas 18 (44%) cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B e 23 (56%) cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C. Entre os pacientes do Grupo II, foram isoladas 15 (68%) cepas de *Haemophilus influenzae* e 7 (32%) cepas de *Streptococcus pneumoniae*. No Grupo III, dos portadores, foram identificadas 8 cepas (47%) de *Neisseria lactamica*, 8 cepas (47%) de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B e 1 cepa (6%) de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C, conforme Tabela 2.

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS NOS GRUPOS I, II, III.

Bactéria	G I		G II		G III	
	n	%	n	%	n	%
<i>Neisseria meningitidis B</i>	18	44%	-	-	8	47%
<i>Neisseria meningitidis C</i>	23	56%	-	-	1	6%
<i>Neisseria lactamica</i>	-	-	-	-	8	47%
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	15	68%	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	7	32%	-	-

Quando os pacientes dos Grupos I e II foram separados em faixas etárias, houve uma diferença significativa ($p < 0,001$ teste Qui-quadrado, $p = 0,0019$ teste T-student) de idade entre o Grupo I e o Grupo II, o que impossibilita a comparação dos resultados de acordo com este parâmetro.

4.2 Imunotipagem dos isolados de *Neisseria meningitidis*

A Tabela 3 indica os resultados da tipagem sorológica do LOS nos isolados de *Neisseria meningitidis*, bem como as combinações encontradas entre a expressão da cápsula polissacarídica e os imunotipos de LOS. A somatória dos imunotipos foi maior do que o número de isolados pois cada cepa pode expressar mais do que um epítipo imunogênico de LOS. Foi possível notar a predominância de L3,7 em relação aos demais tipos sorológicos de LOS, bem como uma associação entre a expressão de L1 e L8 com polissacarídeo capsular B, e L2 e L6 com polissacarídeo capsular C.

TABELA 3. RELAÇÃO ENTRE SOROGRUPOS E IMUNOTIPOS EXPRESSOS PELOS ISOLADOS DE *Neisseria meningitidis* EM PACIENTES DO GRUPO I.

<i>Neisseria meningitidis</i>	Sorogrupo B		Sorogrupo C		Total	
Imunotipo	n	%	n	%	n	%
L1	5	100	-	0	5	12,8
L2	1	7	13	93	14	35,9
L3,7	14	48	15	52	29	74,4
L6	-	0	11	100	11	28,2
L8	7	88	1	12	8	20,5
L10	1	100	-	0	1	2,6

4.3 Estabelecimento de Soro Padrão e Curva de Calibração

As curvas apresentadas no Gráfico 1 representam a relação entre a absorbância e a concentração (log diluição) dos anticorpos IgG anti-LOS presentes no soro de referência.

Após análise, foram obtidos os valores de r^2 apontados na Tabela 4, indicando que houve correlação entre a concentração de anticorpos no soro de referência e as absorbâncias obtidas nos ensaios de ELISA usando todos os LOS (L1, L2, L3,7, L6, L8, L10, Op-) como antígenos.

Após a análise de regressão linear, foi possível verificar que não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre as inclinações das retas obtidas pela reação do soro de referência com cada um dos imunotipos de LOS.

TABELA 4. VALORES DE r^2 E p . CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTICORPOS NO SORO DE REFERÊNCIA E ABSORBÂNCIAS

Antígeno	Valores de p	
	Correlação r^2	Paralelismo p
L1	0,956	0,8300
L2	0,981	0,9990
L3,7	0,935	-
L6	0,996	0,2700
L8	0,988	0,8100
L10	0,966	0,3445
Op-	0,975	0,3010

GRÁFICO 1. CURVAS OBTIDAS PELA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA CADA UM DOS ANTÍGENOS NO SORO DE REFERÊNCIA (S2337).

A análise de regressão linear gerou as retas representadas no Gráfico 2. Os resultados obtidos através desta análise, permitiram concluir que as diferenças nas inclinações das retas obtidas na reação do soro de referência contra cada imunotipo não foram significantes ($p=0,6449$); mas que as diferenças nas elevações entre as retas foram extremamente significantes ($p=0,0002154$). Como as diferenças entre as inclinações não foram significantes, isto é, as retas foram paralelas, foi possível usar a reta obtida pela reação do soro de referência com o imunotipo L3,7 (curva de calibração) para a análise de todos os dados.

GRÁFICO 2. REGRESSÃO LINEAR – CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS NO SORO DE REFERÊNCIA E VALORES DE ABSORBÂNCIA.

Esta curva de calibração (soro de referência diluído 1:100 x L3,7) foi incluída em todos os ensaios de ELISA, independente do antígeno testado. Para todos os antígenos trabalhou-se com a mesma curva de calibração e por este motivo, os valores obtidos puderam ser comparados entre si. Como não existem soros de referência específicos para os imunotipos de LOS, cujas concentrações de IgG para cada imunotipo sejam conhecidas, foi necessário atribuir um valor arbitrário para a concentração de IgG no soro usado como referência neste experimento. A concentração adotada foi de 2000 unidades de IgG anti-L3,7 por mililitro (U/mL).

4.4 ELISA para anticorpos anti-LOS

Os resultados do ELISA encontram-se nos Anexos I, II e III.

A Tabela 5 indica que não foram encontradas diferenças significativas nas médias geométricas das concentrações de IgG contra os imunotipos de LOS nos soros de fase aguda dos pacientes pertencentes aos Grupos I e II e também nas amostras do Grupo III (portadores).

Para o imunotipo L1 ($p=0,0984$), foi possível verificar que a média das respostas do Grupo I em relação aos Grupos II e III sofreu um discreto aumento, enquanto que para o imunotipo L3,7 ($p=0,0526$), foi possível verificar uma discreta diminuição na média das concentrações de IgG anti-LOS no Grupo I em relação aos demais grupos.

TABELA 5. **FASE AGUDA.** MÉDIA DAS CONCENTRAÇÕES DE IgG DOS SOROS DOS GRUPOS I, II E III. ANÁLISE DA VARIÂNCIA (ANOVA).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	<i>p-valor</i>
	Média ± dp	Média ± dp	Média ± dp	ANOVA
L1	245 ± 2	176 ± 2	154 ± 2	0,0984
L2	202 ± 3	158 ± 2	147 ± 2	0,3611
L3,7	129 ± 3	224 ± 3	221 ± 2	0,0526
L3,7S	202 ± 2	171 ± 2	176 ± 2	0,7627
L6	185 ± 2	191 ± 2	265 ± 2	0,1143
L8	245 ± 2	221 ± 2	262 ± 2	0,7272
L10	388 ± 2	446 ± 3	469 ± 2	0,7285
Op-	101 ± 3	176 ± 2	150 ± 2	0,1012

Apesar dos soros dos indivíduos do Grupo III terem sido coletados durante o período de colonização da nasofaringe por *Neisseria meningitidis* (47% sorogrupo B, 6% sorogrupo C) e por *Neisseria lactamica* (47%), não foram encontrados títulos mais elevados de anticorpos anti-LOS do que nos pacientes do Grupo I ou II na fase aguda da doença.

No entanto, ao analisar as diferenças nas concentrações de IgG anti-LOS entre os dois tempos – agudo e convalescente – houve um aumento significativo ($p<0,05$) do segundo em relação ao primeiro, aumento que ocorreu apenas para o Grupo I, conforme foi possível verificar com o cálculo da razão entre as médias das concentrações de IgG na fase aguda e convalescente. Para o imunotipo L3,7, o aumento da concentração foi de aproximadamente 8 vezes enquanto que mesmo os menores aumentos, excederam em 3 vezes a concentração inicial, como observado para os anticorpos anti-L1, L10 e Op- (Tabela 6).

TABELA 6. **FASE CONVALESCENTE.** MÉDIA GEOMÉTRICA DAS CONCENTRAÇÕES DE IgG DOS SOROS DOS PACIENTES DOS GRUPOS I E II. ANÁLISE DA VARIÂNCIA.

	Grupo I	Grupo II	<i>p-valor</i>	<i>GI – Razão entre fase aguda e convalescente</i>
	Média ± dp	Média ± dp	ANOVA	
L1	821 ± 2	150 ± 2	<0,0001	3,35
L2	1164 ± 3	147 ± 2	<0,0001	5,76
L3,7	992 ± 5	189 ± 3	<0,0001	7,68
L3,7S	1620 ± 4	108 ± 2	<0,0001	8,02
L6	871 ± 4	156 ± 2	<0,0001	4,71
L8	934 ± 3	181 ± 2	<0,0001	3,81
L10	1176 ± 3	428 ± 3	0,0011	3,03
Op-	347 ± 3	141 ± 2	<0,0001	3,44

Conforme apontado na Tabela 5, foi observada a maior média da concentração de anticorpos no período de fase aguda para o antígeno L10, enquanto que os valores mais baixos, inferiores aos do Grupo II foram observados para Op-, o que revelou a baixa afinidade deste antígeno por anticorpos direcionados para os epítomos de LOS.

A Figura 3 representa a cinética da produção de anticorpos nos soros dos pacientes e controles entre as fases aguda e convalescente, em logaritmo de unidade arbitrária por mililitro (log U/mL).

FIGURA 3. CINÉTICA DOS ANTICORPOS IgG ANTI-LOS DE *Neisseria meningitidis* EM SOROS DOS GRUPOS I E II -FASES AGUDA E CONVALESCENTE.

Foi possível verificar que houve um aumento significativo ($p<0,0001$) de anticorpos específicos anti-L1 e anti-L2 nos soros dos pacientes do Grupo I em relação à fase da doença, o que não foi verificado para o Grupo II.

Houve também um aumento significativo ($p<0,0001$) de anticorpos contra o antígeno L3,7 em suas duas formas (sem e com ácido siálico terminal) apenas nos soros dos pacientes do Grupo I. Esta mesma diferença foi verificada para os antígenos L6 ($p<0,0001$), L8 ($p<0,0001$), L10 ($p=0,0011$) e Op- ($p<0,0001$).

Em todos os casos, as médias das concentrações de IgG contra os imunotipos de LOS, nos soros dos pacientes do Grupo I em fase convalescente foram maiores do que naqueles coletados durante a internação – o que não ocorreu para o Grupo II (controle).

Ao comparar mais detalhadamente a resposta anticórpica elaborada para os antígenos L3,7 e L3,7S (variante com ácido siálico) foi possível verificar uma maior resposta contra o antígeno sialilado ($p= 0,051$), conforme indicado no Gráfico 3.

GRÁFICO 3. MÉDIA DE ANTICORPOS IgG (LOG U/mL) CONTRA L3,7 E L3,7S.
GRUPO I – FASE CONVALESCENTE.

4.5 ELISA de Inibição

No ensaio de inibição, 5 µg/mL de antígeno solúvel foram capazes de bloquear ao máximo a ligação dos anticorpos anti-LOS presentes no “pool” ao antígeno adsorvido à placa, como mostra o Gráfico 4 (ver ANEXO IV).

GRÁFICO 4. INIBIÇÃO DA REAÇÃO LOS-IgG EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (µg/mL) DE ANTÍGENOS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS EM SOLUÇÃO.

Como este perfil se reproduziu em todos os ensaios, os percentuais de inibição foram calculados a partir desta concentração de antígeno. A Figura 4 representa os resultados dos ensaios de inibição, apontando o percentual da reação que não foi inibida por antígenos solúveis (L1, L2, L3,7, L6, L8, L10, Op, ST) previamente incubados com o “pool” de soros. Os percentuais foram calculados pela razão entre a absorbância verificada após o ensaio com o antígeno solúvel e àquela verificada na ausência do inibidor, multiplicados por cem. As barras em azul (■) representam antígenos heterólogos que não inibiram a reação dos anticorpos do “pool” com o antígeno adsorvido à placa. A barra em rosa (■) indica o percentual de reação, após a incubação do “pool” com o antígeno homólogo presente na solução. As barras em amarelo (■) indicam os antígenos heterólogos que inibiram a reação dos anticorpos com o antígeno adsorvido à placa, em cada um dos casos.

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS REAÇÕES DE INIBIÇÃO DA INTERAÇÃO LOS-IgG PELA PRESENÇA DOS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS (L1 AO L10) E HETERÓLOGOS.

Em nenhum dos casos houve inibição da reação quando os antígenos em solução foram o LPS de salmonela ou o LOS Op- de *Neisseria meningitidis*. Para as demais estruturas de LOS, a inibição foi variável, mas nunca atingindo os percentuais máximos verificados (em média 63,5%) quando o antígeno solúvel era o mesmo (homólogo) que estava em fase sólida. As reações com menor interferência (10 a 20%) de antígenos heterólogos foram as que ocorreram com os imunotipos L8 e L3,7. Ao contrário, os anticorpos anti-L10 foram inibidos por praticamente todos os outros LOS de *Neisseria meningitidis* em percentuais elevados. Enquanto L10 solúvel inibiu 74% da reação do “pool” com o antígeno homólogo aderido à placa, L2, L3,7 e L6 inibiram respectivamente 46%, 63% e 64% da

reação, aproximando-se à média de inibição que é verificada quando o antígeno homólogo é utilizado como inibidor. Também foi interessante observar que quando L10 foi utilizado em outras reações como antígeno heterólogo, ele não foi capaz de promover inibição.

Somente foi possível verificar reciprocidade nas reações entre os imunotipos L3,7 e L2, sendo que L3,7 inibiu em cerca de 32% a reação de L2 com o “pool”, enquanto que L2 inibiu em 20% a reação de L3,7.

5. DISCUSSÃO

A expressão de LOS pelo meningococo é regulada por variações no número de resíduos de citosina e guanina presentes nos tratos homopoliméricos que antecedem as seqüências de leitura dos genes *lgt*. A alteração no número desses resíduos pode ativar, inativar ou manter inalterada a seqüência de leitura destes genes, responsáveis pela produção das enzimas que transferem os açúcares terminais à cadeia do LOS, acarretando em variações fenotípicas. Como a imunotipagem é um método de avaliação do fenótipo e a expressão de LOS pode ser alterada em função de condições ambientais, o uso desta técnica para fins epidemiológicos é limitado. As novas técnicas de tipagem molecular permitem prever o repertório de LOS que uma cepa de *Neisseria meningitidis* poderá expressar (JENNINGS, 1999; ZHU, 2002).

Este trabalho baseado no método fenotípico de tipagem não teve como objetivo, a avaliação epidemiológica, mas sim, verificar o perfil de LOS normalmente expresso por *Neisseria meningitidis* em uma população de pacientes com doença meningocócica, principalmente quando isolado de pacientes com doença invasiva.

A prevalência do imunotipo L3,7 (74%), nas cepas pertencentes aos sorogrupos B e C (Tabela 3), foi coerente com os dados publicados em literatura. JONES et al. (1992) verificaram em seus trabalhos, que 80% das cepas isoladas de doença invasiva expressavam o imunotipo L3,7.

Foi possível verificar que a expressão do imunotipo L3,7 esteve uniformemente distribuída entre as cepas dos sorogrupos B e C (48% e 52%), o que não ocorre com os demais imunotipos. De acordo com a Tabela 3, foi possível verificar a correlação entre a expressão dos imunotipos L1 e L8 em isolados de *Neisseria meningitidis* B e ao mesmo tempo, a relação entre a expressão dos imunotipos L2 e L6 pelos isolados de *Neisseria meningitidis* C. Além disso, como apenas uma das cepas isoladas expressava o imunotipo L10, os achados deste trabalho são coerentes com

os dados de ZHU et al (2002), que relacionam a expressão dos imunotipos L9 ao L12 às cepas de *Neisseria meningitidis* pertencentes ao sorogrupo A.

MORAN et al. (1994) relacionam a expressão de L8, cuja estrutura não permite a adição de um resíduo de ácido siálico, a uma maior capacidade do meningococo de invadir o epitélio da nasofaringe e ao mesmo tempo, a uma maior susceptibilidade ao soro humano. Entre as cepas isoladas dos pacientes com doença meningocócica, 8 (20%) expressaram simultaneamente os imunotipos L3,7 e L8 na membrana externa. Como a expressão de L8 pode sofrer mudança de fase para a expressão de L3,7 (JENNINGS et al., 1999), este achado pode indicar que, ao passar pela corrente circulatória do paciente, estas cepas sofreram mudança de fase na expressão de LOS.

Examinando a Tabela 4, foi possível verificar que houve uma boa correlação entre as concentrações de IgG nos soros dos pacientes e os valores de absorbância obtidos no ensaio de ELISA. Esta correlação permitiu validar o experimento e ainda criou condições para uma análise conjunta dos dados, mesmo quando os LOS usados para sensibilizar as placas foram diferentes. Após análise de regressão linear elaborada quando o soro de referência foi testado separadamente com todos os imunotipos de LOS, foi possível verificar que as retas resultantes foram paralelas (Tabela 4) mas não sobrepostas, ou seja, as concentrações de anticorpos foram diferentes para cada antígeno (Gráficos 1 e 2).

Estas observações favoreceram a adoção de uma curva de calibração única nos ensaios de ELISA para todos os imunotipos e consequentemente, possibilitaram a comparação entre todos os dados, o que foi realizado nos gráficos da Figura 3.

Nos resultados do ELISA (Tabela 5) não houve diferença significativa entre as concentrações de IgG dos soros dos pacientes em fase aguda (Grupos I e II) e nos soros dos portadores (Grupo III). Como no Grupo II foram incluídos pacientes com meningite por *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, que possuem estruturas de LOS química e sorologicamente distintas do LOS de *Neisseria meningitidis*, os resultados

obtidos com os soros destes pacientes foram considerados inespecíficos. Assim, ao comparar os grupos I e II em fase aguda, não foi possível afirmar que houve uma produção específica de anticorpos anti-LOS de *Neisseria meningitidis*. O mesmo ocorreu com os indivíduos do Grupo III, que apesar de serem colonizados por *Neisseria meningitidis*, não apresentaram concentrações de IgG anti-LOS que pudessem ser atribuídas a uma resposta induzida pela colonização da nasofaringe.

KAHLER et al. (1998) detectaram, em seus estudos, a presença de anticorpos bactericidas em portadores de *Neisseria meningitidis*, o que não pareceu ocorrer neste experimento. Entre os indivíduos do Grupo III, 4 (23%) possuíam a concentração de IgG semelhante àquela verificada no Grupo II durante o período convalescente (ANEXO III). No entanto, como o tempo de colonização não é conhecido, não foi possível determinar se o mesmo foi insuficiente para induzir resposta imune específica, ou se a colonização periférica por *Neisseria meningitidis* não é capaz de estimular resposta sistêmica com a produção de anticorpos anti-LOS.

Após o período de convalescença (Tabela 6), houve um aumento significativo nas concentrações de anticorpos contra todos os imunotipos de LOS nos soros dos pacientes do Grupo I, o que não ocorreu nos soros do Grupo II. Esta evidência sustenta a relação entre infecção por *Neisseria meningitidis* e a produção de anticorpos específicos anti-LOS.

Na Tabela 6 foram incluídos índices que indicam o número de vezes em que a concentração de IgG anti-LOS sofreu aumento nos pacientes do Grupo I, após o período de convalescença (média de 20 dias), que coincide também com o tempo necessário para que o sistema imunológico responda com a produção de anticorpos específicos. O aumento foi superior em 3 vezes para os anticorpos contra todos os imunotipos de LOS, chegando aproximadamente a 8 vezes para IgG anti-L3,7, que é o LOS mais freqüentemente expresso por cepas invasivas de *Neisseria meningitidis*, e também, o mais freqüentemente identificado entre as amostras utilizadas neste estudo (74%, Tabela 3).

Ao comparar a resposta de anticorpos contra os protótipos de L3,7 com e sem ácido siálico, foi possível verificar uma concentração surpreendentemente maior de IgG direcionada à variante adicionada de um resíduo de ácido siálico (L3,7S). Este resultado é, até certo ponto, inesperado, uma vez que o ácido siálico é homólogo às moléculas de adesão da célula neural humana e por este motivo, é um importante fator de virulência que está associado à capacidade de evasão do sistema imunológico pelas cepas patogênicas de *Neisseria meningitidis* (De VOE et al, 1982).

A especificidade dos anticorpos produzidos contra os diferentes epítomos de LOS foi confirmada pelos ensaios de inibição. Com exceção de L10, os anticorpos produzidos contra os demais imunotipos de LOS praticamente não sofreram inibição por antígenos heterólogos e foram inibidos de modo importante pela presença do homólogo em solução.

As médias das concentrações de IgG, direcionadas contra os epítomos de L10 foram superiores às verificadas para os demais epítomos nos soros dos pacientes dos dois grupos (fase aguda, Tabela 5) e portadores. A presença de anticorpos contra os epítomos de L10 não tem relação com a expressão deste imunotipo pelas cepas isoladas dos pacientes, já que apenas um dos isolados foi positivo para este antígeno.

Se foram encontradas altas concentrações de IgG anti-L10 nos soros dos pacientes, sem que estes houvessem entrado em contato com o antígeno, é possível supor que este antígeno deve compartilhar epítomos com as estruturas antigênicas encontradas em outras moléculas de LOS. Esta hipótese pode ser sustentada pela observação dos resultados do ELISA de Inibição (Figura 4).

O LPS de salmonela, que foi utilizado no ensaio de inibição não foi capaz de impedir a ligação dos anticorpos aos seus antígeno específicos, e sua adição foi importante como controle de uma possível reação inespecífica por anticorpos anti-lipídio A.

Nos ensaios de inibição, quando o antígeno usado para sensibilizar as placas foi o L10, houve grande inibição dos anticorpos presentes no “pool”

pelos LOS heterólogos; os percentuais variaram de 11 a 64 pontos, enquanto que a inibição pelo antígeno homólogo foi de 74%. Os antígenos que inibiram mais fortemente a reação do “pool” padrão com L10 foram L3,7, L6 e L2, com 63%, 64% e 46% de inibição, respectivamente (Figura 4). Por outro lado, o L10 solúvel não foi capaz de inibir a reação dos anticorpos contra os demais imunotipos de LOS, indicando que provavelmente os outros LOS têm em sua estrutura os carboidratos de L10, mas que L10 não apresenta os epítomos terminais responsáveis pela especificidade dos anticorpos anti-L1, L2, L3,7, L6 e L8, o que é coerente com a estrutura aparentemente truncada do L10 (Tabela 1).

Resultados similares foram descritos por PLESTED et al. (1999, 2003) que desenvolveram um anticorpo monoclonal (MabB5) capaz de reconhecer o “core” interno do LOS e que reage de forma cruzada com vários imunotipos de LOS, principalmente aqueles com estrutura truncada.

Esta capacidade dos anticorpos anti-L10 ligar indiscriminadamente diferentes estruturas de LOS, inclusive L3,7, que o MabB5 não é capaz de reconhecer (PLESTED et al, 2003), torna o L10 interessante como antígeno vacinal, uma vez que LPS detoxificado normalmente é adicionado à vacina anti-meningocócica como adjuvante da formulação e neste caso poderia servir também como indutor de resposta imune específica.

O LOS truncado Op-, diferentemente de L10, não apresentou afinidade por anticorpos produzidos pela resposta imune humoral de pacientes com doença meningocócica, uma vez que as concentrações de anticorpos que o reconheceram foram as menores. Além disso, Op- não foi capaz de inibir a reação dos anticorpos presentes no “pool” contra os demais imunotipos de LOS.

Apesar de não ter sido possível esclarecer se o estado de portador de *Neisseria meningitidis* induz resposta imune humoral anti-LOS, esta ficou evidente em pacientes com doença meningocócica. No entanto, a função biológica dos anticorpos específicos para os imunotipos de LOS ainda não foi determinada, o que seria importante, principalmente em relação aos anticorpos anti-L10.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo foi possível verificar uma prevalência do imunotipo L3,7 nas bactérias isoladas de pacientes com doença invasiva e que houve uma correlação entre a expressão dos imunotipos L1 a L8 com a expressão de cápsula polissacarídica B e C.

Os resultados obtidos demonstram que houve um aumento significativo na concentração de anticorpos específicos IgG anti-LOS nos soros de fase convalescente dos pacientes com meningite meningocócica em relação aos de fase aguda, indicando que a infecção por *Neisseria meningitidis* induz a produção de anticorpos específicos para os diferentes epítomos de LOS.

Os anticorpos IgG anti-L3,7 direcionados contra a variante adicionada de um resíduo de ácido siálico foram significativamente maiores do que aqueles direcionados para a variante sem ácido siálico.

Anticorpos anti-L10 foram produzidos em concentrações elevadas e foram capazes de ligar epítomos de outros imunotipos de LOS de *Neisseria meningitidis* como L1, L2, L3,7, L6 e L8.

ANEXOS

ANEXO IA. RESULTADOS ELISA (U IgG/mL) – GRUPO I

IMUNOTIPO DE LOS								
Paciente	L1 A	L1 C	L2 A	L2 C	L3,7 A	L3,7 C	L3,7S A	L3,7S C
466	242	1265	71	1198	95	622	109	2157
468	66	376	367	1172	81	317	112	123
471	1149	3464	505	598	251	389	282	2408
809	458	5962	210	9684	114	2030	209	5976
886	-	-	-	-	-	-	-	-
891	99	-	155	-	56	-	-	-
968	-	-	-	-	-	-	-	-
1176	1263	2298	357	1326	148	364	182	525
1214	398	2548	596	1760	75	2864	192	3187
1335	398	266	1030	1148	253	405	347	974
1338	244	1247	294	1324	399	81440	358	36490
1418	263	342	150	523	86	347	140	658
1462	247	1408	178	13960	93	13220	158	8934
1597	131	1369	445	3645	200	3187	350	3399
1742	246	403	303	402	71	107	129	423
1781	152	822	71	184	99	281	117	245
1784	160	340	112	3862	75	2422	292	6959
2117	517	1106	309	5369	326	13210	300	9567
2121	1238	626	163	1153	157	985	134	809
2122	209	1279	2345	2123	788	4264	1149	3006
2123	133	1082	43	450	30	173	96	874
2193	156	-	245	-	111	-	-	-
2337	329	1743	247	1403	286	1470	657	3173
2361	-	223	-	474	-	272	-	-
2415	-	70	-	3145	-	1683	-	-
2463	157	202	49	245	27	105	69	281
2479	660	727	59	369	42	322	74	489
2486	116	448	127	676	76	151	167	962
2504	53	1429	50	730	22	392	-	-
2509	81	853	347	1532	334	313	166	-
2677	338	543	812	2111	907	5950	1732	6659
2684	230	520	168	527	150	439	115	194
2717	254	2119	223	815	246	1362	174	1345
2871	116	1384	66	1525	71	997	85	2596
2891	638	420	3582	2598	1654	1186	3585	2256
2901	108	504	134	6539	86	30410	72	25780
2939	300	812	146	601	70	194	152	443
3021	545	4363	67	3425	125	13760	85	9248
3084	598	594	349	650	312	552	301	428
1641	124	748	53	144	44	349	111	387
1667	119	814	83	298	104	476	192	1809

A= FASE AGUDA, C=FASE CONVALESCENTE, (-)=SORO INSUFICIENTE

ANEXO IB. RESULTADOS ELISA (U IgG/mL) – GRUPO I

IMUNOTIPO DE LOS								
Paciente	L6 A	L6 C	L8 A	L8 C	L10 A	L10 C	Op A	Op C
466	97	2684	121	1881	136	1183	180	1278
468	74	80	117	596	131	204	181	206
471	297	829	328	293	488	1427	450	1596
809	185	7553	531	6300	665	12830	146	1288
886	-	-	-	-	-	-	-	-
891	133	-	85	-	145	-	91	-
968	-	-	-	-	-	-	-	-
1176	317	699	802	1795	759	828	358	533
1214	149	1397	340	2115	2928	2638	168	674
1335	758	2299	228	326	605	733	196	191
1338	227	503	266	2455	495	787	120	409
1418	374	804	79	299	336	626	139	176
1462	264	9296	281	2664	135	771	88	241
1597	311	1834	309	1178	593	1866	117	119
1742	107	371	533	2389	122	232	122	216
1781	123	340	147	474	349	1161	98	322
1784	226	335	582	541	350	930	157	239
2117	283	7506	760	4554	1485	10951	462	8464
2121	213	1231	285	792	439	1284	94	224
2122	1000	1880	1361	1719	1063	2866	203	281
2123	133	885	230	2561	169	805	77	266
2193	131	-	144	-	315	-	256	-
2337	339	1905	351	2304	328	1953	265	345
2361	-	286	-	571	-	324	-	541
2415	-	183	-	150	-	1259	-	1246
2463	105	230	137	535	250	440	78	184
2479	123	390	110	638	402	1057	91	470
2486	137	284	147	508	272	308	72	95
2504	133	476	154	8622	108	768	1	471
2509	122	278	121	705	355	1212	83	258
2677	139	314	288	355	883	1997	185	218
2684	240	283	276	614	732	1220	138	204
2717	256	1764	410	470	734	2119	62	309
2871	135	1408	163	1976	163	1237	0	87
2891	618	345	808	600	580	664	177	200
2901	34	35690	120	827	255	11140	136	680
2939	134	358	184	418	253	552	31	48
3021	122	5017	266	1958	597	7487	163	2291
3084	368	678	265	394	630	1302	107	197
1641	159	975	186	337	703	451	36	111
1667	98	470	151	723	305	854	62	559

A= FASE AGUDA, C=FASE CONVALESCENTE, (-)=SORO INSUFICIENTE

ANEXO IIA. RESULTADOS ELISA (U IgG/mL) – GRUPO II

IMUNOTIPO DE LOS								
Paciente	L1 A	L1 C	L2 A	L2 C	L3,7 A	L3,7 C	L3,7S A	L3,7S C
773	47	151	133	409	391	539	32	45
779	165	207	455	511	505	471	64	34
808	348	115	186	118	495	77	512	72
813	397	45	235	54	693	70	963	78
836	-	139	-	141	-	449	-	-
869	725	489	504	199	1528	480	-	-
887	-	38	-	82	-	84	-	-
906	367	421	75	55	96	126	157	154
974	493	480	224	168	3223	3168	368	324
990	52	134	41	36	55	22	64	49
1163	223	225	178	156	441	482	382	481
1307	66	104	61	120	69	215	105	122
1350	47	35	94	78	63	80	107	59
1423	198	173	262	236	164	128	-	-
1633	161	98	307	380	245	323	506	294
1688	51	-	198	-	90	320	-	-
1734	100	111	138	202	138	160	99	72
2651	485	1568	130	102	98	86	126	73
2673	225	116	213	111	212	87	-	-
2735	288	50	146	215	349	280	352	449
2999	96	112	70	288	56	81	104	48
3078	310	257	157	156	146	-	150	144

A= FASE AGUDA, C=FASE CONVALESCENTE, (-)=SORO INSUFICIENTE

ANEXO IIB. RESULTADOS ELISA (U IgG/mL) – GRUPO II

Paciente	IMUNOTIPO DE LOS							
	L6 A	L6 C	L8 A	L8 C	L10 A	L10 C	Op A	Op C
773	53	57	52	121	98	188	54	49
779	133	123	54	53	256	144	120	129
808	131	120	74	145	2352	153	661	125
813	309	100	300	111	3980	86	874	117
836	-	171	-	172	-	1560	-	246
869	270	135	334	175	3370	1514	226	140
887	-	112	-	88	-	271	-	183
906	90	105	389	424	235	331	213	205
974	268	252	529	411	1345	2652	406	369
990	135	91	63	47	240	148	57	40
1163	323	247	180	193	1837	920	261	285
1307	157	436	222	392	176	4241	141	223
1350	139	77	167	111	113	173	86	177
1423	424	329	708	227	531	993	135	127
1633	339	133	355	122	400	288	593	167
1688	172	-	154	-	104	-	92	-
1734	161	172	326	319	71	83	106	92
2651	196	160	178	142	204	869	114	96
2673	320	162	373	301	519	245	171	80
2735	253	294	442	543	770	910	223	331
2999	131	142	255	223	347	230	139	97
3078	279	331	440	322	927	870	114	128

A= FASE AGUDA, C=FASE CONVALESCENTE, (-)=SORO INSUFICIENTE

ANEXO III. RESULTADOS ELISA (U IgG/mL) – GRUPO III

Paciente	IMUNOTIPO DE LOS							
	L1	L2	L3,7	L3,7S	L6	L8	L10	Op
Fc15/1	202	105	134	-	200	363	341	105
Fc15/2	197	177	120	148	156	219	372	135
Fc15/3	151	120	238	288	159	313	448	169
Fc 5/2	248	161	435	215	293	280	1337	195
Fc18/1	176	148	550	96	246	344	722	168
Fc18/7	147	272	331	368	456	673	700	386
Fc18/9	78	106	114	100	167	113	173	122
Fc29/3	156	224	156	87	299	164	478	275
Fc29/12	172	310	385	375	438	312	810	224
Fc29/13	71	118	167	124	163	216	1481	124
Fc25/9	155	176	259	277	324	294	461	299
Fc43/5	99	105	87	160	254	249	249	87
Fc38/1	825	576	519	785	712	534	432	108
Fc38/2	108	108	181	204	212	147	380	72
Fc38/12	118	49	140	50	130	176	241	86
Fc38/5	74	63	105	72	586	168	162	103
Fc38/6	251	150	683	243	275	374	927	163

(-)=SORO INSUFICIENTE

ANEXO IV. RESULTADOS ELISA INIBIÇÃO

Absorbância	Inibidores								Controle
% de Reação	L1	L2	L3,7	L6	L8	L10	Op-	St	Negativo
L1	0,497	1,112	1,117	1,314	0,733	1,295	1,239	2,005	1,164
%	43%	96%	96%	113%	63%	111%	106%	172%	100%
L2	1,575	0,539	1,025	1,311	1,296	1,334	1,458	1,958	1,511
%	104%	36%	68%	87%	86%	88%	96%	130%	100%
L3,7	1,719	1,260	0,510	1,468	1,761	1,582	1,692	1,661	1,585
%	108%	80%	32%	93%	111%	100%	107%	105%	100%
L6	0,899	0,648	0,506	0,416	0,992	0,824	0,952	0,964	0,854
%	105%	76%	59%	49%	116%	97%	112%	113%	100%
L8	2,010	1,877	1,586	1,653	0,615	1,625	1,635	1,758	1,851
%	109%	101%	86%	89%	33%	88%	88%	95%	100%
L10	0,438	0,264	0,179	0,175	0,371	0,126	0,491	0,589	0,490
%	89%	54%	37%	36%	76%	26%	100%	120%	100%

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBIGER, B.; JOHANSSON L.; JONSSON, A.B. Lipooligosaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* shows altered pilus-associated characteristics. **Infect. Immun.** v.71, n.1, p.155-162, 2003.
2. ANDERSEN, S.R.; BRYN, K.; THORSENG, K.; JANTZEN, E. Heterogeneity of lipopolysaccharides of *Neisseria meningitidis* revealed by thin-layer chromatography combined with monoclonal antibodies. **J. Microbiol. Met.** v.25, p.187-194, 1996.
3. ANDERSEN, S.R.; BJUNE, G.; HOIBY, E.A.; MICHAELSEN, T.E.; AASE, A.; RYE, V.; JANTZEN, E. Outer membrane vesicle vaccines made from short-chain lipopolysaccharide mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*: effect of the carbohydrate chain length on the immune response. **Vaccine.** v15, n.11, p.1225-1234, 1997.
4. ANDERSEN, S.R.; GUTHRIE, T.; GUILLE, G.R.; KOLBERG, J.; HOU, S.; HYLAND, L.; WONG, S.Y.C. Cross-reactive polyclonal antibodies to the inner core of lipopolysaccharide from *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.** v.70, n.3, p.1293-1300, 2002.
5. ARKING, D.; TONG, Y.; STEIN, D.C. Analysis of lipooligosaccharide biosynthesis in the *Neisseriaceae*. **J. Bacter.** v.183, n.3, p.934-941, 2001.
6. BARROSO, D.E. Doença meningocócica. In: BATISTA, R.S.; GOMES, A.P.; IGREJA, R.P.; HUGGEN, D.W. **Medicina Tropical, Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro. Cultura Médica, 2001. v.1, cap. 57, p.521-549.

7. BASH, M.C.; LESIAK, K.B.; BANKS, S.D.; FRASCH, C.E. Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques. **Infect. Immun.** v.63, p.1484-1490, 1995.
8. CHARALAMBOUS, B.M.; FEAVERS, I.M. Peptide mimics elicit antibody responses against the outer-membrane lipooligosaccharide of group B *Neisseria meningitidis*. **FEMS Microb. Lett.** v.191, p.45-50, 2000.
9. CHARALAMBOUS, B.M.; EVANS, J.; FEAVERS, I.M.; MAIDEN, M.C.J. Comparative analysis of two meningococcal immunotyping monoclonal antibodies by resonant mirror biosensor and antibody sequencing. **Clin. Diag. Lab. Immun.** v.6, n.6, p.838-843, 1999.
10. De VOE, I.W. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. **Microbiol. Rev.** v.46, p.162-190, 1982.
11. De VRIES, F.P.; Van Der ENDE, A.; Van PUTTEN, J.P.; DANKERT, J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. **Infect. Immun.** v.64, n.8, p.2998-3006, 1996.
12. DRABICK, J.J.; BRANDT, B.L.; MORAN, E.; SAUNDERS, N.B.; SHOEMAKER, D.R.; ZOLLINGER, W.D. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. **Vaccine** v.18, p.160-172, 1999.
13. ESTABROOK, M.M.; GRIFFISS, J.M.; JARVIS, G.A. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-*N*-neotetraose. **Infect. Immun.** v.65, n.11, p.4436-4444, 1997.

14. FEATHERS, I.M.; SUKER, J.; MCKENNA, A.J. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.** v.60, p.3620-3629, 1992.
15. FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. **Doença meningocócica**. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/sus/epi/pdfs/situacao_doencas.pdf. Acesso em 20 janeiro 2004.
16. GAMIAN, A.; BEURRET, M.; MICHON, F.; BRISSON, J.R.; JENNINGS, H.J. Structure of the L2 lipopolysaccharide core oligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. **J. Biol. Chem.** v.267, n.2, p.922-925, 1992.
17. GRIFFIS, J.M., Mechanisms of host immunity. In: CARTWRIGHT, K. **Meningococcal Disease**. Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.35-70.
18. GRIFFIS, J.M.; BRANDT, B.L.; SAUNDERS, N.B.; ZOLLINGER, W.D. Structural relationships and sialylation among meningococcal L1, L8 and L3,7 lipooligosaccharide serotypes. **J. Biol. Chem.** v.275, n.13, p.9716-9724, 2000.
19. HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed, p.149, 1994.
20. INGALLS, R.R.; LIEN, E.; GOLENBOCK, D.T. Membrane-associated proteins of a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through toll-like receptor 2. **Infect. Immun.** v.69, n.4, p.2230-2236, 2001.

21. JENNINGS, M.P.; HOOD, D.W.; PEAK, I.R.A.; VIRJI, M.; MOXON, E.R.
Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-*N*-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.** v.18, n.4, p.729-740, 1995.

22. JENNINGS, M.P.; SRIKHANTA, Y.N.; MOXON, E.R.; KRAMER, M.; POOLMAN, J.T.; KUIPERS, B.; Van Der LEY, P. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. **Microb.** v.145: p.3013-3021, 1999.

23. JENNINGS, M.P.; BERRINGTON, A.W.; MOXON, E.R. Molecular analysis of the meningococcal LPS expression. In: POLLARD, A.J.; MAIDEN, M.C.J. **Methods in molecular medicine**. Totaria: Humana Press, 2001. Cap.14, p.203-214.

24. JENSEN, T.J.; KHARAZMI, A.; SHAND, G.; NIELSEN, H.; TVEDE, M. Immunological properties of meningococcal lipopolysaccharide from serogroups A, B, C. **APMIS**. v.104, p.54-60, 1996.

25. JONES, D.M.; BORROW, R.; FOX, A.J.; GRAY, S.; CARTWRIGHT, K.A.; POOLMAN, J.T. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. **Microb. Pathog.** v.13, n.3, p.219-224, 1992.

26. KAHLER, C.M.; MARTIN, L.E.; SHIH, G.C.; CARLSON, R.W.; STEPHENS, D.S. The (α 2 $\rightarrow$ 8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. **Infect. Immun.** v.66, n.12, p.5939-5947, 1998.

27. KIM, J.J.; ZHOU, D.; MANDRELL, R.E.; GRIFFISS, J.M. Effect of exogenous sialylation of the lipooligosaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* on opsonophagocytosis. **Infect. Immun.** v.60, n.10, p.4439-4442, 1992.
28. LAPINET, J.A.; SCAPINI, P.; CALZETTI, F.; PÉREZ, O.; CASSATELLA, M.A. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 β , IL-8, macrophage inflammatory protein 1 α , MPI-1 β , and gamma interferon-inductible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. **Infect. Immun.** v.68, n.12, p.6917-6923, 2000.
29. LEE, F.K.N.; STEPHENS, D.S.; GIBSON, B.W.; ENGSTROM, J.J.; ZHOU, D.; APICELLA, M.A. Microheterogeneity of *Neisseria* lipooligosaccharide: analysis of a UDP-glucose 4 – epimerase mutant of *Neisseria meningitidis* NMB. **Infect. Immun.** v.63, n.7, p.2508-2515, 1995.
30. MANDRELL, R.E.; ZOLLINGER, W.D. Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition. **Infect. Immun.** v.16, n.2, p.471-475, 1977.
31. MICHON, F.; BEURRET, M.; GAMIAN, A.; BRISSON, J.R.; JENNINGS, H.J. Structure of the L5 lipopolysaccharide core oligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. **J. Biol. Chem.** v.265, n.13, p.7243-7247, 1990.
32. MORAN, E.E.; BRANDT, B.L.; ZOLLINGER, W.D. Expression of the L8 lipopolysaccharide determinant increases the sensitivity of *Neisseria meningitidis* to serum bactericidal activity. **Infect. Immun.** v.62, n.12, p. 5290-5295, 1994.
33. MORLEY, S.L.; POLLARD, A.J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? **Vaccine.** p.666-687, 2002.

34. PAVLIAK, V.; BRISSON, J.R.; MICHON, F.; UHRIN, D.; JENNINGS, H.
Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*.
J. Biol. Chem. v.268, n.19, p.14146-14152, 1993.
35. PLESTED, J.S.; MAKEPEACE, K.; JENNINGS, M.P.; GIDNEY, M.A.J.;
LACELLE, S.; BRISSON, J.R.; COX, A.D.; MARTIN, A.; BIRD, A.G.;
TSANG, C.M.; MACKINNON, F.M.; RICHARDS, J.C.; MOXON, E.R.
Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope
of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.** v.67, n.10, p.5417-5426, 1999.
36. PLESTED, J.S.; GIDNEY, M.A.; COULL, P.A.; GRIFFITHS, H.G.;
HERBERT, M.A.; BIRD, A.G.; RICHARDS, J.C.; MOXON, E.R. Enzyme
linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of serum
antibodies to the inner core lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*
group B. **J. Immunol Meth.** v.237, p.73-84, 2000.
37. PLESTED, J.S.; FERRY, B.L.; COULL, P.A.; MAKEPEACE, K.;
LEHMANN, A.K.; MacKINNON, F.G.; GRIFFITHS, H.G.; HERBERT,
M.A.; RICHARDS, J.C.; MOXON, E.R. Functional opsonic activity of
human serum antibodies to inner core lipopolysaccharide (gal E) of
serogroup B meningococci measured by flow cytometry. **Infect. Immun.**
v.69, n.5, p.3203-3213, 2001.
38. PLESTED, J.S.; HARRIS, S.L.; WRIGHT, J.C.; COULL, P.A.;
MAKEPEACE, K.; GIDNEY, M.A.J.; BRISSON, J.R.; RICHARDS, J.C.;
GRANOFF, D.M.; MOXON, E.R. Highly conserved *Neisseria meningitidis*
inner-core lipopolysaccharide epitope confers protection against
experimental meningococcal bacteremia. **J. Infect. Dis.** v.187, p.1223-
1234, 2003.
39. POLLARD, A.J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to
Neisseria meningitidis. **Vaccine** v.19, p.1327-1346, 2001.

40. POPOVIC T.; AJELLO, G.; FACKLAM, R. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. CDC, World Health Organization, 1999.
41. RAM, S.; MACKINNON, F.G.; GULATI, S.; McQUILLEN, D.P.; VOGEL, V.; FROSCHE, M.; ELKINS, C. GUTTORNSEN, H.K.; WETZLER, L.M.; OPPERMAN, M.; PANGBURN, M.K.; RICE, P.A. The contrasting mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. **Mol. Immunol.** v.36, p.915-928, 1999.
42. ROSENQVIST, E.; HOIBY, E.A.; WEDEGE, E.; BRYN, K.; KOLBERG, J.; KLEN, A.; RONNELD, 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.** v.63, n.12, p.4642-4652, 1995.
43. ROSENSTEIN, N.E.; PERKINS, B.A.; STEPHENS, D.S.; POPOVIC, T.; HUGHES, J.M. Meningococcal Disease. **N. Engl. J. Med.** v.344, n.18, p.1378-1388, 2001.
44. SACCHI, C.T.; LEMOS, A.P.S.; POPOVIC, T.; MORAIS, J.C.; WHITNEY, A.M.; MELLES, C.E.; BRONDI, L.M.; MONTEIRO, L.M.; PAIVA, M.V.; SOLARI, C.A.; MAYER, L.W. Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: Overview and implications for vaccine development. **J. Clin. Microbiol.** v.39, n.8, p.2897-2903, 2001.
45. SAUNDERS, N.B.; BRANDT, B.L.; WARREN, B.D.H.; HANSEN, B.D.; ZOLLINGER, W.D. Immunological and molecular characterization of three variant subtype P1.14 strains of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.** v.66, n.7, p.3218-3222, 1998.

- 46.SAUNDERS, N.B.; SHOEMAKER, D.R.; BRANDT, B.L.; MORAN, E.E.; LARSEN, T.; ZOLLINGER, W.D. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. **Infect. Immun.** v.67, n.1, p.113-119, 1999.
- 47.SOININEN, A.; Van Der DOBBELSTEEN, G.; OOMEN, L.; KAYHTY, H. Are the enzyme immunoassays for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides serotype specific? **Clin. Diag. Labor. Immunol.** v.7, n.3, p.468-476, 2000.
- 48.STEEGHS, L.; KUIPERS, B.; HAMSTRA, H.J.; KERSTEN, G.; VanALPHEN, L.; Van Der LEY,P. Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. **Infect. Immun.** v.67, n.10, p.4988-4993, 1999.
- 49.STEPHENS, D.S.; EDUARDS, K.M.; MORRIS, F.; MCGEE, Z.A. Pili and outer membrane appendages on *Neisseria meningitidis* in the cerebrospinal fluid of an infant. **J. Infect. Dis.** v.146, p.568, 1982.
- 50.SWARTLEY, J.S.; MARFIN, A.A.; EDUPUGANTI, L.J.; LIU, L.J.; CIESLAK, P.; PERKINS, B.; WENGER, J.D.; STEPHENS, D.S. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Microbiol.** v.94, p.271-276, 1997.
- 51.TSAI, C.M.; CIVIN, C.I. Eight lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis* react with a monoclonal antibody which binds lacto-N-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc). **Infect. Immun.** v.59, n.10, p.3604-3609, 1991.
- 52.TSAI, C.M.; KAO, G.; ZHU, P. Influence of the length of the lipooligosaccharide α chain on its sialylation in *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.** v.70, n.1, p.407-411, 2002.

53. TSANG, R.S.W.; LAW, D.K.S.; TSAI, C.M.; NG, L.K. Detection of the *lst* gene in different serogroups and LOS immunotypes of *Neisseria meningitidis*. **FEMS Microb Lett.** v.199, p.203-206, 2001.
54. TZENG, Y.L.; STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbes Infect.** p.687-700, 2000.
55. Van DEUREN, M.; BRANDTZAEG, P.; Van Der MEER, J.W.M. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. **Clin. Microbiol. Rev.** v.13, n.1, p.144-166, 2000.
56. Van Der LEY, P.; STEEGHS, L.; HAMSTRA, H.J.; HOVE, J.; ZOMER, B.; ALPHEN, L. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* *lpxL* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. **Infect. Immun.** v.69, n.10, p.5981-5990, 2001.
57. VERHEUL, A.F.; SNIPPE, H.; POOLMAN, J.T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. **Microbiol. Rev.** v.57, n.1, p.34-49, 1993.
58. VOGEL, U.; CLAUS, H.; HEINZE, G.; FROSCH, M. Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal disease isolates. **Infect. Immun.** v.67, n.2, p.954-957, 1999.
59. WAKARCHUK, W.; MARTIN, A.; JENNINGS, M.P.; MOXON, E.R.; RICHARD, J.C. Functional relationships of the genetic locus encoding the glycosyltransferase enzymes involved in expression of the lacto-*N*-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. **J. Biol. Chem.** v.271, n.32, p.19166-19173, 1996.

60. WEDEGE, E.; CAUGANT, D.; FROHOLM, L.O.; ZOLLINGER, W.D. Characterization of serogroup A and B strains of *Neisseria meningitidis* with serotype 4 and 21 monoclonal antibodies and by multilocus enzyme electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** v.29, p.1486-1492, 1990.
61. WELLS, D.B.; TIGHE, P.J.; WOOLDRIDGE, K.G.; ROBINSON, K.; ALDEEN, D.A. Differential gene expression during meningeal-meningococcal interaction: evidence for self-defense and early release of cytokines and chemokines. **Infect. Immun.** v.69, p.2718-2722, 2001.
62. WHO. World Health Organization. **Meningococcal meningitis.** Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs141/en>. Acesso em 01 outubro 2003.
63. WHO. World Health Organization. **Meningococcal disease in Burkina Faso.** Disponível em: http://www.who.int/csr/don/2003_05_02/en. Acesso em 22 janeiro 2004.
64. 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 group B serotypes. **Mol. Microbiol.** v.6, p.3493-3499, 1992.
65. ZOLLINGER, W.D.; MANDRELL, R.E. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid-phase radioimmunoassay. **Infect. Immun.** v.18, n.2, p.424-433, 1977.
66. ZHU, P.; KLUTCH, M.J.; BASH, M.C.; TSANG, R.S.W.; NG, L.K.; TSAI, C.M. Genetic diversity of three *lgt* loci for biosynthesis of lipooligosaccharide (LOS) in *Neisseria* species. **Microbiol.** v.148, p.1833-1844, 2002.