



Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - INCQS  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

**Prevalência e variabilidade genética de antígenos candidatos vacinais em  
isolados clínicos de *N. meningitidis* circulantes no Brasil**

Cinthia dos Santos Silva Romanelli

Rio de Janeiro  
2012

Cinthia dos Santos Silva Romanelli

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ANTÍGENOS CANDIDATOS  
VACINAIS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *N. MENINGITIDIS* CIRCULANTES NO  
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Dr. Ivano de Filippis

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Romanelli, Cinthia dos Santos Silva

Prevalência e variabilidade genética de antígenos candidatos vacinais em isolados clínicos de *N. meningitidis* circulantes no Brasil./ Cinthia dos Santos Silva Romanelli. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

95 f.; il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientador: Ivano de Filippis.

1. *Neisseria meningitidis* 2. MLST 3. Vacina meningocócica 4. fHbp.

Prevalence and genetic variability of candidate vaccine antigens among invasive *N. meningitidis* isolates in Brazil.

Cinthia dos Santos Silva Romanelli

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ANTÍGENOS CANDIDATOS  
VACINAIS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *N. MENINGITIDIS* CIRCULANTES NO  
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 20 / 07 / 2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino  
INCQS/Fiocruz

---

Dra. Lúcia Martins Teixeira  
IPPMG/UFRJ

---

Dra. Maria Regina Branquinho  
INCQS/Fiocruz

---

Dr. Ivano de Filippis - Orientador  
INCQS/Fiocruz

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que fez com que eu trilhasse esse caminho para que pudesse descobrir que quando queremos, somos capazes de tudo.

Ao meu orientador, Dr. Ivano de Filippis, a quem tenho um enorme respeito e admiração pelo pesquisador que é e amigo que demonstrou ser. Agradeço por ter me aceito como sua aluna, pela confiança depositada no meu trabalho, e é claro pela paciência ao longo desses anos.

À Dra Maysa Mandetta e ao Dr. Antônio Eugênio pelos momentos de perseverança, conselhos e descontração, jamais me esquecerei desses momentos!

À Dra Cláudia Maria da Conceição e ao Dr. Filipe Quirino, que com generosidade me encheram de força e coragem para ingressar no Mestrado.

Aos colegas de mestrado Nathália Caldeira, Jaciara Oliveira e Guilherme Sardinha, pelo companheirismo e amizade.

A todos do Laboratório de Microrganismos de Referência por terem me acolhido, em especial à Claudia Andrade, pela sua generosidade, pelo apoio nos momentos mais críticos e acima de tudo pela amizade durante esses anos.

Ao CNPq que, através da concessão de bolsa, viabilizou a realização desta pesquisa.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária pela atenção com que sempre me foi dada, em especial à Dra Kátia Christina Leandro pelo apoio e momentos de compreensão e amizade.

Aos amigos do IFF/Fiocruz pelo apoio nesta etapa final, em especial Dra Deborah Ribeiro, Luciana del Estal, Flávia Oliveira e Anna Paula Sousa.

Aos meus pais, que mesmo com todas as dificuldades não pouparam esforços para me educar e oferecer as condições necessárias para que eu estudasse.

Ao meu amor, Guilherme, que sempre acreditou em mim e me apoiou. Obrigada por fazer parte da minha vida!

A todos os professores com os quais tive a oportunidade e o prazer de aprender.

A todos meus familiares, amigos e colegas pelo apoio e incentivo que me deram até o dia de hoje.

A todos que confiaram e contribuíram de algum modo para que esse trabalho fosse realizado.

Muito obrigada!

“Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas ...”

Luiz Fernando Veríssimo





## RESUMO

A doença meningocócica permanece como um problema de saúde pública, estando relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças e lactentes. A rápida evolução da doença requer uma intervenção terapêutica específica e precoce, e enfatiza a necessidade de disponibilizar vacinas que possam ser utilizadas na prevenção dessa doença. Estratégias utilizando proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* como antígeno estão sendo desenvolvidas para a produção de uma vacina universal contra o sorogrupo B, que pode, inclusive, conferir proteção contra outros sorogrupos. Duas vacinas se encontram atualmente em ensaios clínicos. A vacina recombinante rFHbp possui duas variantes da proteína fHbp (V1 e V2) como antígeno, e a vacina 4CMenB é uma vacina multicomponente que inclui três proteínas (fHbp, NHBA e NadA) combinadas com OMVs da cepa epidêmica da Nova Zelândia. Embora estes antígenos sejam relativamente conservados, os mesmos já demonstraram variabilidade em diferentes regiões. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência e diversidade genética destes antígenos em isolados clínicos de *N. meningitidis* sorogrupos B e C circulantes no Brasil. A caracterização dos isolados pelo MLST revelou seis complexos clonais principais (CCS ST-41/44, ST-1136, ST-32/ET-15, ST-8/A4, ST-11/ET-37 E ST 103). Todos os isolados apresentaram o gene de *fHbp*, onde a variante 1 foi predominante para sorogrupo B e a variante 2 para o sorogrupo C. O gene *NHBA* também foi identificado em todos os isolados. Apenas 29,73% dos isolados apresentaram o gene *nadA*. Nenhuma das cepas analisadas apresentou o mesmo subtipo de PorA presente na OMV que compõe a vacina, não sendo interessante a inclusão desta vesícula em uma possível vacina brasileira. Apenas três variantes de VR3 de PorA foram identificadas, demonstrando a baixa variabilidade desta região da proteína e a possível aplicação em uma vacina. Indícios de troca de cápsula foram encontrados em alguns isolados, o que reforça a necessidade de monitorar a recombinação genética do meningococo que através desse recurso pode escapar da proteção conferida por vacinas conjugadas eficientes como a vacina conjugada C. A vacina rFHbp demonstrou uma maior cobertura teórica em comparação com a vacina 4CMenB, porém ainda há a necessidade de se cobrir possíveis mecanismos de escape do meningococo.

Palavras - chave: *Neisseria meningitidis*; MLST; Vacinas meningocócicas.

## ABSTRACT

Meningococcal disease remains a public health problem causing high case-fatality rates worldwide, especially among young children and young adults. The rapid evolution of the disease requires specific and fast therapeutic actions and the use of prophylaxis through vaccination is the best choice to halt the spread of the disease. New vaccine approaches using surface exposed proteins from *Neisseria meningitidis* have been developed for the design of a universal vaccine against serogroup B, which could also elicit protection against other serogroups. Two vaccines using this strategy are currently through clinical trials. The recombinant vaccine rfHbp with two fHbp antigenic variants (V1 and V2) and the multicomponent vaccine 4CMenB including three proteins (fHbp, NHBA and NadA) combined with an OMV from the New Zealand vaccine strain. Although these are highly conserved antigens, some genetic variation has been already observed within their genes. The main objective of this study was to evaluate the prevalence and genetic diversity of these antigens among *N. meningitidis* serogroup B and C isolates circulating in Brazil. The characterization of such isolates by MLST analysis, revealed the presence of six main clonal complexes (CCS ST-41/44, ST-1136, ST-32/ET-15, ST-8/A4, ST-11/ET-37 E ST 103). The gene *fHbp* was amplified from all isolates and Variant 1 was predominant among serogroup B and Variant 2 among serogroup C. Gene *NHBA* was also amplified from all isolates. Gene *nadA* was only amplified from 29.73% of all isolates. We didn't find any strain matching the same PorA subtype of the OMV used in the 4CMenB vaccine, thus the inclusion of such bacterial structure in a future vaccine to be used in Brazil would be useless. Only three PorA VR3 variants were detected showing the low diversity of this protein region and the possible inclusion of this structure on a future vaccine. We have detected a possible indication of capsule "switching" among some isolates which shows the need of a wide surveillance of meningococcal strains that can escape the protection of serogroup C conjugate vaccines. The rfHbp vaccine suggested that it could show a higher efficiency when compared with 4CMenB, but it is important to cover possible scape mechanisms showed by several strains.

Keywords: *Neisseria meningitidis*; MLST; meningococcal vaccines.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de <i>Neisseria Meningitidis</i> .....	17
Tabela 2: Função e classificação das principais estruturas de <i>N. meningitidis</i> .....	19
Tabela 3: Iniciadores empregados para a caracterização de antígenos de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	43
Tabela 4: Descrição dos genes e seus respectivos iniciadores utilizados em MLST de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	49
Tabela 5: Distribuição e classificação das cepas <i>N.meningitidis</i> estudadas.....	52
Tabela 6: Isolados estratificados por complexo clonal (CC) e sorogrupo.....	54
Tabela 7: Distribuição dos genótipos mais frequentes de Nm por ano e região...	58
Tabela 8: Características genotípicas de isolados com possível <i>capsule switching</i> .....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia de meningococo (cocos gram-negativos aos pares).....	15
Figura 2: Figura esquemática da estrutura celular da <i>Neisseria meningitidis</i> .....	16
Figura 3: Petéquias e “rash” cutâneo na doença meningocócica.....	21
Figura 4: Distribuição global do meningococo. Sorogrupos e subtipos predominantes.....	27
Figura 5: Aplicação da Vacinologia Reversa no desenvolvimento de vacinas contra infecções causadas por <i>N. meningitidis</i> sorogrupo B.....	32
Figura 6: Figura esquemática de <i>N. meningitidis</i> sorogrupo B e os antígenos vacinais em estudo .....	33
Figura 7: Alelo 1 de fHbp. Exemplo da composição de um alelo.....	34
Figura 8: Topologia dos aminoácidos da proteína porina A, PorA, e suas regiões variáveis.....	46
Figura 9: Esquema das etapas da metodologia utilizada para MLST.....	48
Figura 10: Distribuição dos isolados sorogrupos B e C por variante da fHbp.....	59
Figura 11: Distribuição das subvariantes de fHbp por sorogrupos .....	61
Figura 12: Distribuição das variantes de NHBA por sorogrupos .....	63
Figura 13: Prevalência de NadA por sorogrupo.....	63
Figura 14: Análise filogenética de fHbp.....	65
Figura 15: Análise filogenética de NHBA.....	66

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM – Amazonas

BA – Bahia

BHE – Barreira hematoencefálica

CC – Complexo clonal

DM – Doença Meningocócica

ET – Tipo eletroforético

FHBP – “*factor H binding protein*”

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LMR – Laboratório de microrganismos de referência

LOS – Lipooligossacarídeos

Mabs – Anticorpos monoclonais

MLEE – “*Multilocus Enzyme Electrophoresis*”

MLST – “*Multilocus Sequence Typing*”

NadA – “*neisserial adhesin A*”

NHBA – “*Neisserial Heparin-Binding protein*”

Nm – *Neisseria meningitidis*

NmB – *Neisseria meningitidis* sorogrupo B

NmC – *Neisseria meningitidis* sorogrupo C

OMP – “*outer membrane proteins*”

OMV – “*outer membrane vesicles*”

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNI – Programa Nacional de Imunização

PE – Pernambuco

RJ – Rio de Janeiro

SC – Santa Catarina

ST – Tipo sequencial

SUS – Sistema único de saúde

VR – Região Variável

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Meningite e doença meningocócica .....	14
1.2. Agente etiológico.....	14
1.3. Características antigênicas.....	15
1.3.1. Cápsula polissacarídica.....	16
1.3.1.1. Troca de cápsula ( <i>capsule switching</i> ).....	18
1.3.2. Proteínas de membrana externa (OMPs).....	18
1.4. Transmissão e manifestações clínicas .....	20
1.5. Diagnóstico e tratamento .....	21
1.6. Tipificação de <i>N.meningitidis</i> .....	23
1.6.1. Métodos fenotípicos .....	23
1.6.2. Métodos genotípicos.....	24
1.6.2.1. Métodos utilizados em estudo populacionais da DM.....	24
1.7. Epidemiologia.....	26
1.8. Vacinas anti-meningocócicas .....	28
1.8.1. Vacinas anti-meningocócicas sorogrupo B .....	29
1.8.1.1. Vacinologia Reversa.....	31
1.8.1.2. Antígenos vacinais promissores .....	32
1.8.1.2.1. FHbp ( <i>factor H binding protein</i> ) .....	33
1.8.1.2.2. NadA ( <i>neisserial adhesin A</i> ) .....	35
1.8.1.2.3. NHBA ( <i>neisserial Heparin-Binding protein</i> ).....	35
1.8.1.3. Vacinas em ensaios clínicos .....	36
1.8.1.3.1. Vacina rfHbp bivalente (Pfizer) .....	36
1.8.1.3.2. Vacina multicomponente 4CMenB (Novartis).....	36
1.9. A Vigilância Sanitária e o controle de qualidade de vacinas .....	37
1.10. Relevância do estudo .....	39
2. OBJETIVO .....	40
2.1. Objetivo geral .....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. METODOLOGIA.....	41
3.1. Seleção das linhagens para o estudo.....	41

3.2. Condição de crescimento dos meningococos .....	41
3.2.1. Extração e purificação do DNA genômico.....	41
3.2.2. Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	42
3.2.3. Sequenciamento.....	43
3.3. Determinação das variantes dos antígenos vacinais.....	44
3.3.1. Análise filogenética dos antígenos vacinais .....	44
3.4. Caracterização dos isolados pelos genes <i>porA</i> e <i>fetA</i> .....	45
3.4.1. Determinação das regiões variáveis (VR) de PorA .....	45
3.4.2. Determinação das regiões variáveis de FetA (FetA VR) .....	47
3.5. MLST .....	47
3.5.1. Amplificação e sequenciamento dos genes .....	47
3.5.2. Análises das sequências.....	50
4. RESULTADOS .....	51
4.1. Caracterização das amostras.....	51
4.2. Caracterização dos Isolados por MLST .....	53
4.3. Caracterização dos isolados pelos genes <i>porA</i> e <i>fetA</i> .....	54
4.3.1. PorA.....	54
4.3.1.2. Região Variável 1 de PorA (VR1).....	54
4.3.1.3. Região Variável 2 de PorA (VR2).....	55
4.3.1.1. Região Variável 3 de PorA (VR3).....	55
4.3.1.4. Classificação por Subtipo (VR1 e VR2) de PorA .....	56
4.3.2. FetA .....	57
4.3.3. Caracterização genotípica dos isolados .....	57
4.4. Prevalência e diversidade de fHbp .....	59
4.5. Prevalência e diversidade de NHBA .....	62
4.6. Prevalência de NadA .....	63
4.7. Análise filogenética de fHbp e NHBA .....	64
4.8. Detecção de uma possível troca de cápsula (capsule switching) .....	67
5. DISCUSSÃO .....	68
6. CONCLUSÕES .....	75
REFERÊNCIAS .....	77



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 . Meningite e doença meningocócica

O significado de meningite é “inflamação das meninges”, sendo estas as membranas que recobrem a massa encefálica e a medula (DE VOE, 1982). É uma doença de muita importância para a saúde pública, tendo em vista sua rápida evolução, facilidade de disseminação, dificuldade de diagnóstico imediato e alta taxa de mortalidade e morbidade dos acometidos (GAMA *et al.*, 1997).

Vários agentes etiológicos podem causar meningites: protozoários, helmintos, fungos, vírus, além de diversas bactérias que ao atingir as meninges podem causar as chamadas meningites bacterianas. Entre estes agentes o mais frequente é a *Neisseria meningitidis*, responsável pela meningite meningocócica (RIEDO *et al.*, 1995). Essa bactéria também pode atingir a corrente sanguínea, levando a um quadro de sepse ou meningococemia onde a multiplicação incontrolável do meningococo aumenta a liberação de endotoxinas podendo levar ao chamado choque séptico com falência múltipla de órgãos (STEPHENS *et al.*, 2007). A meningococemia e a meningite são, portanto as duas formas da chamada doença meningocócica (DM) (ROSEINSTEIN *et al.*, 2001).

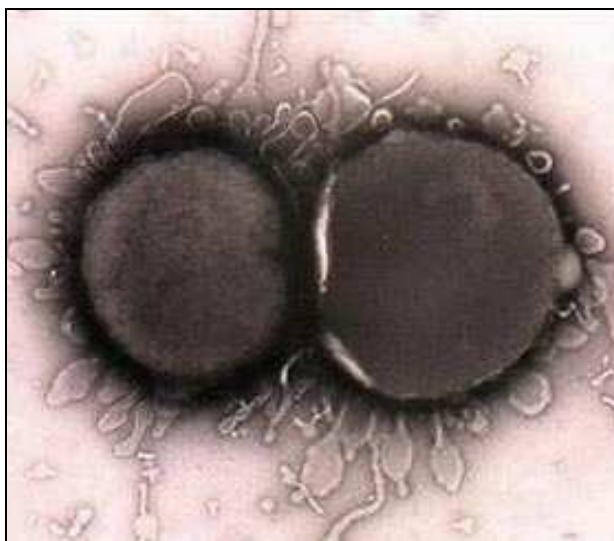
### 1.2 . Agente etiológico

*Neisseria meningitidis* (Nm) pertencente à classe  $\beta$ -Proteobacteria e à família *Neisseriaceae*. *N. meningitidis*, se apresenta como diplococo Gram-negativo, imóvel, não formador de esporos, possuindo uma cápsula polissacarídica que reveste a membrana externa da bactéria (figura 1). Quando em cultura, a bactéria que pode ser isolada do sangue ou do líquido do paciente, forma colônias mucosas, não pigmentadas, não hemolíticas com tamanho variando de 0,6 a 0,8 micrômetros de diâmetro. Entretanto, cepas isoladas da nasofaringe de portadores saudáveis frequentemente apresentam colônias opacas sugerindo ausência da cápsula ou menor

quantidade de polissacarídeo (BRICKS, 2002; VOLK *et al.*, 1996; STEPHENS, 2007).

É uma bactéria aeróbica preferindo ambiente úmido e temperatura de 37°C para crescimento ótimo; o crescimento pode ser amplificado em ambiente com concentração de 5-10% de CO<sub>2</sub> (ARDITI & YOGEV, 1997). O único reservatório natural do meningococo é o homem, sendo seu habitat a nasofaringe humana, geralmente sem causar infecção (JANDA & KNAPP, 2003). O meningococo se mostra sensível à dessecação, aos raios solares e às variações de temperatura. As culturas não sobrevivem mais do que três dias sobre a bancada e a sobrevivência em temperatura (4 a 8°C) e umidade baixas não ultrapassa a três horas, fazendo com que a existência em vida livre não seja possível (BARROSO, 2000).

**Figura 1.** Micrografia de meningococo, cocos gram-negativos aos pares



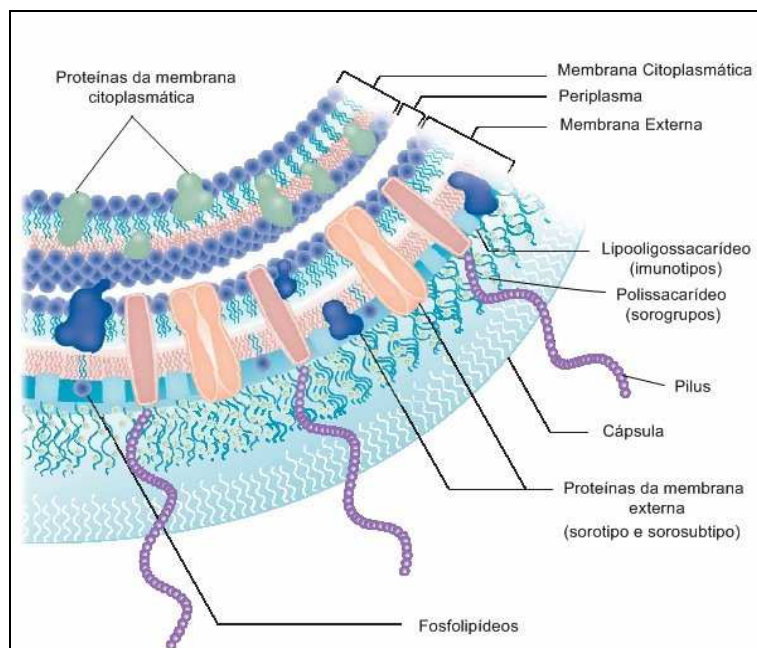
Fonte: ( DAYMAM, 2009).

### 1.3. Características antigênicas

O meningococo é circundado por uma membrana externa, contendo pili, proteínas de membrana externa (OMP – *outer membrane proteins*) e lipooligossacarídeos (LOS). Entretanto, os meningococos patogênicos possuem

ainda uma cápsula polissacarídica ligada à membrana externa, que é um dos fatores de virulência mais bem definidos até o momento (figura 2) (NASSIF, 2000; TZENG & STEPHENS, 2000; VAN DAUREN *et al.*, 2000).

**Figura 2.** Figura esquemática da estrutura celular da *Neisseria meningitidis*, adaptado de ROSENSTEIN *et al.*, 2001.



### 1.3.1. Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica confere ao meningococo propriedades protetoras contra fagocitose e bacteriólise, possibilitando sua sobrevivência durante a invasão da corrente sanguínea ou do líquido do hospedeiro. Oferece ainda propriedades antiaderentes que permitem a transmissão, disseminação e sobrevivência em compartimentos externos e internos, como por exemplo, os vacúolos fagocíticos. Repulsão através de carga negativa, impedimento estérico e cobertura de ligantes de aderência são mecanismos propostos para as propriedades anti-adesivas da cápsula (TZENG & STEPHENS, 2000).

Os antígenos da cápsula polissacarídica permitem a classificação de *N. meningitidis* em diferentes sorogrupos. Atualmente existem 13 sorogrupos identificados: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, M, W135, X, Y e Z. Com relação à

patogenicidade, destacam-se 5 sorogrupos: A, B, C, W135 e Y, sendo estes responsáveis por mais de 90% dos casos da doença (CAROFF & KARIBIAN, 2003). A cápsula destes meningococos associados à doença invasiva é basicamente composta de derivados do ácido siálico, exceto para o sorogrupo A, que é formada pela polimerização do N-acetil D-manosamina fosfato (TZENG & STEPHENS, 2000; TAHA, 2002). Na tabela 2 se encontra a descrição detalhada da composição química dos principais sorogrupos patogênicos.

Os sorogrupos são identificados através das técnicas de soro-aglutinação, coaglutinação ou empregando anticorpos monoclonais (MAbs) em técnicas de *ELISA* (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) ou *dot-blotting* (JANDA & KNAPP, 2003). Abordagens de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido amplamente utilizadas para a determinação dos sorogrupos principalmente a partir de material clínico com resultado negativo após testes convencionais (TAHA, 2000; TAHA, 2002).

A amplificação do gene *siaD*, que codifica a poli-sialiltransferase, determina os sorogrupos B, C, Y e W135 (TAHA, 2000; POLLARD *et al.*, 2002;) enquanto o sorogrupo A pode ser determinado através da amplificação do gene *mynB* (que codifica a enzima que atua na polimerização da N-acetil-D-manosamina) ou *orf2* (TAHA, 2000; TAHA, 2002).

**Tabela 1.** Composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de *Neisseria meningitidis* (adaptado de TAHA, 2002).

SOROGRUPO	CÁPSULA POLISSACARÍDICA
A	$\alpha$ -N-acetil D- manosamina -1-fosfato
B	$\alpha$ -2,8, ácido N-acetilneuramínico
C	$\alpha$ -2,9, ácido N-acetilneuramínico
W135	D-galactose e ácido N-acetilneuramínico
Y	D-glicose e ácido N-acetilneuramínico

### 1.3.1.1. Troca de cápsula (*Capsule Switching*)

Alterações de estruturas antigênicas, como o polissacarídeo capsular, é uma estratégia comum de patógenos bacterianos para escapar do sistema imune do hospedeiro, este fenômeno é chamado de “*capsule switching*”. Estudos indicam que esta mutação pode ocorrer por conversão do gene da polimerase da cápsula e que este evento ocorre *in vivo* (SWARTELEY *et al.*, 1997; ACALÁ *et al.*, 2002; BEDDEK *et al.*, 2009).

Presume-se que a co-colonização de cepas dos sorogrupos B e C na nasofaringe humana e o intercâmbio genético são os eventos responsáveis pela mudança de cápsula. Linhagens recombinantes expressando sorogrupo B ou C tem sido descritas como resultantes de *capsule switching* (SWARTELEY *et al.*, 1997). Um evento semelhante, com isolados W135, também foi recentemente descrito (BEDDEK *et al.*, 2009). Todos os sorogrupos seriam capazes de mudar para qualquer outro, com exceção do sorogrupo A, pois seu polissacarídeo é bioquimicamente diferente dos demais sorogrupos patogênicos (SWARTELEY *et al.*, 1997; ACALÁ *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Proteínas de Membrana Externa (OMPs)

As classes de proteínas de membrana externa (OMPs) (1 a 5) são identificadas de acordo com seu peso molecular e seu comportamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (TSAI *et al.*, 1981). OMPs de classe 1 a 3 são porinas, sendo as de classe 1 denominadas PorA e as de classe 2 e 3 de PorB; a proteína de classe 4 é chamada de proteína RmpM (*reduction modifiable protein M*). As OMPs de classe 5 são constituídas pelas proteínas Opa (*Opacity proteins*). Todos os meningococos possuem várias OMPs de classe 1, 4 e 5, e somente uma das OMPs de classe 2 ou de classe 3 (ROSENSTEIN *et al.*, 2001).

As porinas funcionam como poros essenciais para a sobrevivência do meningococo, pois modulam a troca de íons entre a bactéria e o meio externo. Podem também interagir com a membrana plasmática de células eucarióticas, causando uma alteração no potencial de membrana e interferência na sinalização celular, sugerindo

que estejam envolvidas na reorganização celular do hospedeiro durante o processo de infecção (NASSIF, 1999; MASSARI *et al.*, 2003).

Estes dados são suportados por análise molecular de coleções de meningococos que contêm isolados com marcadores genéticos idênticos, mas que expressam diferentes polissacarídeos capsulares (SWARTELEY *et al.*, 1997).

**Tabela 2:** Função e classificação das principais estruturas de *N. meningitidis* (BAETHGEN, 2007).

<i>COMPONENTE</i>	<i>FUNÇÃO</i>	<i>CLASSIFICAÇÃO</i>
<b>1. Cápsula Polissacarídica</b>	Protege contra mediadores do hospedeiro, bacteriólise complemento-dependente e fagocitose	13 sorogrupos (A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W135, X, Y, Z)
<b>2. Proteínas de Membrana Externa (PME)</b>		
<b>2.1. Porinas</b>	Formam poros através dos quais passam solutos hidrofílicos, cátion-seletivos ou ânions-seletivos	
2.1.1. PorA		Proteína de membrana externa Classe 1 (sorosubtipagem)
2.1.2. PorB		Proteína de membrana externa Classe 2 ou 3 (sorotipagem)
<b>2.2. Proteínas opacidade-associadas</b>		
2.2.1. Opa	Promove a aderência às células epiteliais e leucócitos do hospedeiro	Proteína de membrana externa Classe 5
2.2.2. Opc	Promove aderência às células do hospedeiro	
<b>2.3. Proteína RmpM</b>	Ligação da membrana externa com peptídeoglicano e interação com porinas	Proteína de Classe 4
<b>3. Lipooligosacárideos</b>	Atividade endotóxica	13 imunotipos: baseados em diferenças na antigenicidade.
<b>4. Pili</b>	Promove aderência às células epiteliais e endoteliais e eritrócitos	Classe I e II: ambos podem ser isolados de pacientes com DM.

#### 1.4. Transmissão e manifestações clínicas

Considera-se que cerca de 5 a 15 % da população em áreas não endêmicas esteja colonizada por meningococos de forma assintomática, sem causar a doença. A transmissão do meningococo ocorre através do contato direto com secreções da nasofaringe do portador assintomático ou do doente (NASSIF *et al.*, 1999; CARVALHANAS, 2005).

Uma vez estabelecida, a doença meningocócica possui uma evolução rápida podendo levar a morte em menos de 48 horas após sua instalação. As manifestações iniciais são febre alta, prostração, dor de cabeça, vômitos, falta de apetite, petéquias (*rash* cutâneo ou púrpura), dor e dificuldade na movimentação do pescoço. O maior risco da doença é o choque séptico que é provocado pela multiplicação da bactéria na corrente sanguínea. No sangue a bactéria libera endotoxinas que estimulam a vasodilatação promovendo diminuição rápida da pressão arterial que pode resultar na falência dos órgãos (CARVALHANAS, 2005; STEPHENS *et al.*, 2007).

No caso de pacientes em tratamento intensivo, o reconhecimento de diferentes processos fisiopatológicos associados à DM proporcionou grandes mudanças no tratamento e na estratégia de gestão para estas duas formas diferentes da doença (STEPHENS, 2007) possibilitando uma melhora do prognóstico.

Uma outra questão importante é que a DM pode ser confundida com outras doenças infecciosas, por isso nos cuidados primários deve sempre haver suspeita de DM em crianças com sinais precoces não-específicos. Logo, o diagnóstico precoce da DM é essencial para a saúde pública, assim como a criação de campanhas educativas que auxiliem no reconhecimento precoce reduzindo a morbi-mortalidade (BULLEN, 2000).

**Figura 3.** Petéquias e “rash” cutâneo na doença meningocócica



Fonte: (STEPHENS *et al.*, 2007).

### 1.5. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico inicial da doença meningocócica consiste em uma avaliação clínica, com o histórico da doença e anamnese. Havendo suspeita de meningite ou meningococemia, o tratamento deve ser imediato antes mesmo que o diagnóstico laboratorial esteja pronto, visto o grande risco de letalidade (CARVALHANAS, 2005; THOMPSON *et al.* 2006).

Um grupo de testes laboratoriais iniciais (hemograma, eletrólitos, proteína C reativa, e cultura) deve ser realizado quando houver suspeita de DM. Além disso, sempre que possível, deve-se realizar a punção lombar e o líquido cefalorraquidiano (LCR) deverá ser enviado ao laboratório para dosagem de glicose, proteínas, contagem diferencial de células e cultura (BRANCO *et al.*, 2007).

O diagnóstico definitivo depende do exame do LCR, cujos achados característicos incluem a pleocitose e também hiperproteínoorraquia, a



hipoglicorraquia e a cultura positiva (ROSENSTEIN *et al.*, 2001; STEPHENS *et al.*, 2007). Segundo Donalizio e colaboradores, (2004), a pesquisa de polissacárideos capsulares no líquido, através das técnicas imunológicas de contra-imunoeletroforese (CIEF) ou aglutinação do látex, são bastante empregadas.

A busca de métodos mais rápidos, sensíveis e específicos levaram à utilização de técnicas moleculares baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Portanto, a detecção do DNA genômico de *N. meningitidis* a partir de material clínico pela PCR, vem sendo cada vez mais utilizada para o diagnóstico de DM, e passou a ser uma importante ferramenta para tipificação e caracterização de isolados. Os métodos de tipificação molecular de *N. meningitidis* são utilizados para a investigação de surtos e para estudos sobre a estrutura genética populacional do microrganismo, com o objetivo de se entender melhor a sua variação e evolução (DE FILIPPIS, 2005; DIGLLE & CLARCK, 2006; MAIDEN, 2008).

O tratamento é realizado por antibioticoterapia e deve ser iniciado assim que forem detectados os primeiros sintomas que levam a suspeita da doença. Por isso a importância do diagnóstico precoce que pode reduzir consideravelmente a taxa de letalidade e as sequelas deixadas pela doença. Vale ressaltar que os contatos dos pacientes acometidos com DM devem receber tratamento antimicrobiano profilático adequado (RIORDAN, 2001; CARVALHANAS, 2005; STEPHENS *et al.* 2007.).

A droga de escolha para o tratamento da DM é a benzilpenicilina ou a ceftriaxona, também podendo ser utilizadas a cefotaxima e clorafenicol (ZEROUALI *et al.*, 2002). Em condições normais de saúde a penicilina não é capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (BHE), porém durante as meningites, as meninges se encontram inflamadas e a penicilina consegue penetrar a BHE rapidamente (ZEROUALI *et al.*, 2002). Uma observação importante é que ocorrência de cepas resistentes às penicilinas tem levado a um aumento da utilização de antimicrobianos de amplo espectro como a vancomicina (CARVALHANAS, 2005; STEPHENS *et al.*, 2007).

A quimioprofilaxia dos contatos primários e secundários dos doentes deve ser realizada com o objetivo de eliminar o meningococo desses portadores para proteger os indivíduos mais suscetíveis. A quimioprofilaxia é útil no controle de surtos localizados, como em escolas e residências, porém não pode ser usada no controle de epidemias pelo seu alto custo e pelo desenvolvimento de resistência aos

antimicrobianos. A droga de escolha para a profilaxia é a rifampicina, porém ceftriaxona, azitromicina e quinolonas também reduzem a colonização do meningococo na nasofaringe (BLOCK & VELASQUES, 2006).

## **1.6. Tipificação de *N. meningitidis***

### **1.6.1. Métodos Fenotípicos**

Diferenças imunológicas e estruturais entre as diferentes classes de proteínas de membrana permitem a subdivisão dos principais sorogrupos em sorotipos (PorB) e soro-subtipos (PorA). A padronização do esquema de sorotipificação dos antígenos de superfície do meningococo, feita à semelhança do esquema de tipificação de *Escherichia coli* e *Salmonella*, determina que uma cepa de *N. meningitidis*, com a fórmula antigênica B:4:P1.15 pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4, soro-subtipo P1.15 (SACCHI *et al.*, 1998a; SACCHI *et al.*, 1998b). Nomenclaturas designadas como NT e NST significam, respectivamente, que as proteínas de sorotipo e soro-subtipo não puderam ser classificadas com os anticorpos monoclonais disponíveis (LEMOS, 2005).

Existe uma variedade de técnicas empregando anticorpos monoclonais para a sorotipificação, tais como soroaglutinação (ZOLLINGER *et al.*, 1984), dot-blotting, ELISA (WEDEGE *et al.*, 1990), radioimunoensaio (ZOLLINGER *et al.*, 1979) e aglutinação em látex .

Com o avanço dos métodos moleculares, foi possível a determinação das sequências de nucleotídeos dos genes que codificam PorA e PorB, elucidando a estrutura e topologia dos epítomos dessas proteínas, apresentando vantagens em relação a sorotipificação tradicional, uma vez que permite a caracterização completa da cepa em estudo. Além disso, o sequenciamento demonstra que a variação de um único aminoácido pode interferir na reatividade com alguns anticorpos monoclonais (MAbs), resultando em cepas não sorotipáveis e/ou não soro-subtipáveis (VAN DER LEY *et al.*, 1991; LEMOS, 2005).

## 1.6.2. Métodos Genotípicos

Epidemiologistas que investigam e desenvolvem intervenções de controle para doenças de notificação compulsória necessitam dispor de um método molecular preciso e reprodutível para a caracterização de isolados. Diferenças no comportamento biológico do patógeno, as necessidades e as variações técnicas, devem ser consideradas quando um determinado método de tipificação é utilizado, seja para investigações de surto, seja para vigilância epidemiológica em escala regional, nacional ou global (STRUELENS *et al.*, 1998). Diversos métodos genotípicos e fenotípicos estão descritos para a caracterização de isolados de *N. meningitidis* e a escolha dos métodos a serem utilizados dependerá das questões epidemiológicas que devem ser respondidas.

### 1.6.2.1. Métodos utilizados em estudos populacionais da DM

Para estudos de vigilância epidemiológica global ou regional devem ser preferencialmente escolhidos métodos que analisam variações genéticas que foram acumulando lentamente na população e que são ditas “seletivamente neutras” (MAIDEN, 2008), pois analisam isolados de longos períodos de incidência de uma determinada doença. Até recentemente, o método genotípico, padrão ouro, para o estudo populacional do meningococo era o *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) (SELANDER *et al.*, 1986). O princípio da técnica baseia-se na identificação de variações de genes que codificam enzimas metabólicas, através das diferenças da sua mobilidade eletroforética em um gel de agarose. A combinação dos padrões de migração para as diferentes enzimas define o “tipo eletroforético” (ET) específico para cada cepa ou grupos de cepas.

Devido às dificuldades metodológicas e de reprodutibilidade, um novo método foi desenvolvido e têm sido amplamente utilizado para o mesmo fim: o *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que é conceitualmente similar ao MLEE, porém utiliza o sequenciamento do DNA para a identificação de variações alélicas de genes constitutivos ou *housekeeping genes* (genes que codificam as mesmas enzimas metabólicas). Diferente do MLEE que somente detecta mudanças não-silenciosas do DNA, que afetam a mobilidade eletroforética da proteína em um gel, no MLST

qualquer polimorfismo do DNA é detectado mesmo sendo uma mutação silenciosa. Assim, um número menor de genes é necessário para a tipificação de isolados por MLST do que pelo MLEE (VOGEL, 2003; URWIN & MAIDEN, 2003). Atualmente, o método do MLST preconiza o sequenciamento de 7 genes constitutivos (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC*, e *pgm*), que foram selecionados por não estarem sujeitos à pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro. A cada sequência (ou alelo), de cada um dos sete genes, é atribuído um número (MAIDEN, 2008). O posterior concatenamento das sequências dos 7 genes permite a realização de diferentes análises filogenéticas dos isolados, fornecendo dados importantes sobre as relações genéticas dos organismos, além do estudo epidemiológico (MAIDEN *et al.*, 1998; ENRIGHT & SPRATT, 1999; BREHONY *et al.*, 2006).

Este método permitiu a comparação de resultados inter-laboratoriais através de um banco de dados global disponível em <http://pubmlst.org/neisseria>. A possibilidade de determinar os genótipos circulantes e comparar sua prevalência em outras regiões de forma inequívoca, tornou esse método o padrão-ouro para a tipificação do meningococo em estudos populacionais, em investigação de surtos e em estudos de portadores assintomáticos (FEAVERS *et al.*, 1999; JOLLEY *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2003; DE FILIPPIS, 2005).

Jolley e colaboradores (2007) propuseram uma série de recomendações a respeito da caracterização molecular de meningococos através de métodos baseados em sequenciamento que incluem: 1) a escolha de alvos gênicos específicos para a caracterização de antígenos: genes *porA* e *fetA* para a investigação rápida de surtos da doença e para investigar a distribuição de variantes antigênicas; e gene *porB* quando necessária uma melhor distinção dos isolados; 2) MLST para determinar o tipo e o complexo clonal de isolados de doença invasiva (ou de portadores) através da seleção representativa de isolados de determinado país ou ainda para situações de vigilância epidemiológica de caráter regional e 3) modificações na nomenclatura dos isolados para a seguinte forma: sorogrupo: variante PorA (anteriormente determinado pela tipificação sorológica como sorotipo): variante FetA: ST-*sequence type* e (complexo clonal). O exemplo a seguir ilustra a forma correta da atual nomenclatura para meningococos de acordo com a European Meningococcal Disease Society (EMGM): B:P1.19,15:F5-1:ST-33 (cc32).

## 1.7. Epidemiologia

A DM ocorre de forma endêmica em todo o mundo, podendo ocorrer também de forma epidêmica. Nos países industrializados, a incidência da DM é baixa, com 1 a 3 casos por cada 100.000 habitantes. Contudo, nos países em desenvolvimento essa taxa pode chegar a 25 casos por 100.000 habitantes (BRICKS, 2002). Na região da África, conhecida como cinturão da meningite, a incidência é bem alta, chegando a atingir 100 a 800 casos por 100.000 habitantes (WILDER-SMITH, 2008).

A ocorrência de meningococos em portadores saudáveis em períodos não epidêmicos apresenta-se entre 5% e 30%. No entanto, essa colonização não é homogênea, pois o estado de portador é incomum nos primeiros anos de vida aumentando progressivamente até 20 a 25% em adultos. Durante as epidemias, até 50% dos indivíduos saudáveis podem estar colonizados pela *N. meningitidis* (BRICKS, 2002).

Apesar das elevadas taxas de colonização da nasofaringe, poucos desenvolvem formas graves de DM. Em menos de 1% dos colonizados a bactéria invade a mucosa, atinge a corrente sanguínea e causa a doença sistêmica, que pode se manifestar em até 10 dias após a colonização. A predominância da bactéria sobre o sistema imune é determinada por fatores relacionados ao agente, ao meio ambiente e ao hospedeiro (ROSENSTEIN *et al.*, 2001).

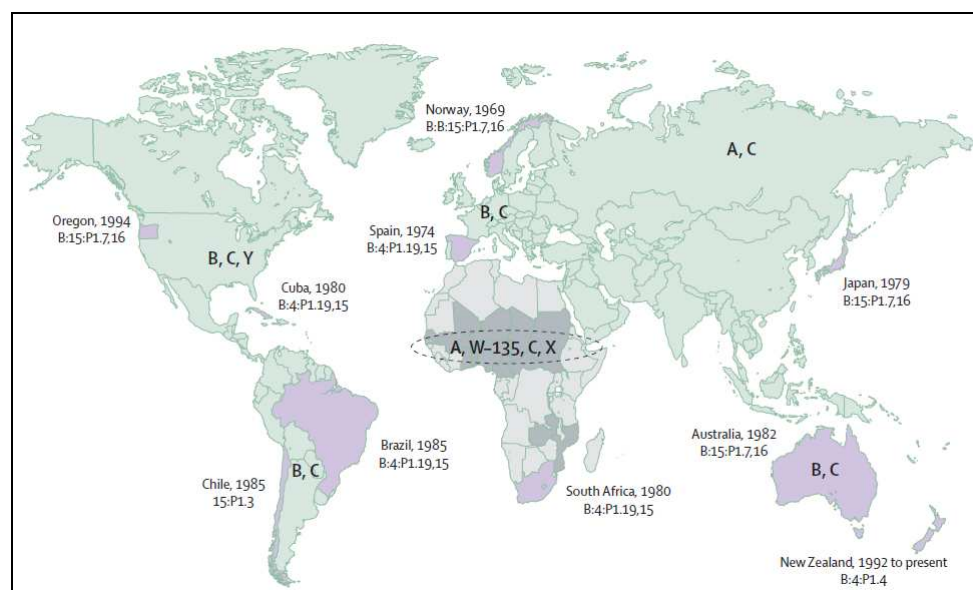
Dentre as meningites bacterianas, a meningocócica é a que apresenta maior potencial para ocasionar epidemias. Contudo, a ocorrência de diferentes sorogrupos varia de região para região. Sorogrupos A, B e C representam a maioria dos casos de doença meningocócica em todo o mundo, com os sorogrupos B e C, responsáveis pela maioria dos casos na Europa e nas Américas, e sorogrupos A, C e W135 predominando na Ásia e África (figura 4). As epidemias geralmente são causadas pelo sorogrupo A e, em menor incidência pelo sorogrupo C. O sorogrupo B é a causa mais importante de meningite endêmica em países industrializados, sendo responsável por 30-40% dos casos na América do Norte e de até 80% em alguns países europeus, e ainda mais na Nova Zelândia (CAUGANT, 1998; POLLARD, 2004; WILDER-SMITH, 2008).

A incidência anual média da DM no mundo varia de 0,5 a 25 casos por 100.000 habitantes. No entanto durante as epidemias, a incidência pode chegar até

500 casos por 100.000 habitantes (SCHWARTZ *et. al.*, 1989; CAUGANT, 1998). A taxa de letalidade pode variar de 5 a 15% sendo que até 25% dos que sobrevivem podem apresentar sequelas. As maiores epidemias de DM tem sido detectadas nos países da África situados abaixo do deserto do Sahara, em uma área chamada de “Cinturão da Meningite”. Nesses países a incidência dessa doença já chegou a atingir até 1000 casos por 100.000 habitantes (HART & ROGERS, 1993; POLLARD, 2004; WILDER-SMITH, 2008).

No Brasil, o principal agente causador das meningites bacterianas é a *N. meningitidis* dos sorogrupos B e C. No período que vai de 1980 ao ano 2000, foram notificados cerca de 80.683 casos da doença, sendo o estado de São Paulo o que mais se destaca representando 35% dos casos. A partir de 2002 observou-se em alguns estados, variação positiva em relação ao percentual do sorogrupo C (49 - 56%) em comparação com o sorogrupo B (46 - 39%). No entanto, a letalidade pelo sorogrupo B tem sido nitidamente mais expressiva quando comparada ao sorogrupo C (CARVALHANAS, 2005), com exceção do estado da Bahia, onde no final de 2009 um surto pelo sorogrupo C aumentou a letalidade da doença em até 50% em alguns municípios do estado (GORLA *et al.*, 2011; GORLA *et al.*, 2012).

**Figura 4.** Distribuição global do meningococo. Sorogrupos e subtipos predominantes. Adaptado de Stephens e colaboradores (2007).



### 1.8. Vacinas anti-meningocócicas

A vacinação é a forma mais eficaz para a prevenção e controle das doenças infecciosas. A resposta imune pode ser mais ou menos eficaz e duradoura dependendo da imunogenicidade do antígeno. No caso da DM, o antígeno mais utilizado nas vacinas é o polissacarídeo capsular encontrado em todas as células de *N. meningitidis*. Além disso, um fator importante sobre o polissacarídeo é que ele apresenta diferentes estruturas e graus de imunogenicidade, de acordo com os diferentes sorogrupos da bactéria. Desta forma, para cada sorogrupo de meningococo, o polissacarídeo correspondente confere uma imunidade específica que não protege para os outros sorogrupos (ROSEINSTAIN *et al.*, 2001; BRICKS, 2002).

Atualmente, as vacinas polissacarídicas disponíveis oferecem proteção para os sorogrupos A, C, W135 e Y. Contudo, essas vacinas, assim como ocorre com outras vacinas polissacarídicas não-conjugadas, não geram resposta imune adequada em crianças abaixo de 2 anos de idade em função da ausência de resposta consistente a antígenos dependentes de linfócitos T nessa faixa etária (FINNE *et al.*, 1987). Outra característica importante dessas vacinas é que mesmo nos pacientes acima de 2 anos de idade, a proteção conferida é de duração limitada, não sendo capazes de induzir memória imunológica. Além disso, apresentam a possibilidade de induzir baixa resposta em doses posteriores. Isso faz com que as vacinas polissacarídicas não sejam usadas de maneira rotineira, estando indicadas apenas para grupos de alto risco ou na presença de surtos ou epidemias (DANZIG, 2004).

Com o objetivo de aumentar a eficiência e a cobertura da vacina iniciou-se na década de 90, a utilização de vacinas conjugadas com proteínas. A conjugação dos polissacarídeos a proteínas carreadoras (toxina diftérica mutante atóxica ou o toxóide tetânico) muda a natureza da resposta antipolissacarídica para uma resposta T dependente potencializando seu efeito imunogênico (MILAGRES & MELLEEN, 1993; SÁFADI & BARROS, 2006). Além disso, por induzirem memória imunológica, essas vacinas tem a capacidade de reduzir a colonização na nasofaringe, diminuindo o número de portadores entre os vacinados e a transmissão da doença na população (BORROW *et al.*, 2002).

### 1.8.1 . Vacinas anti-meningocócicas sorogrupo B

O problema da DM ainda não está resolvido, apesar do sucesso considerável no desenvolvimento de drogas e vacinas. Epidemias por *N. meningitidis* ocorreram em pelo menos 30 países desde 1970, a maioria delas causadas pelos sorogrupos A, B, C e W135 (DANZIG, 2004). Neste contexto, dentre as meningites bacterianas, a causada pelo meningococo do sorogrupo B vem apresentando uma grande incidência, o que levou ao desenvolvimento de estudos em vários países para o desenho de uma vacina segura e eficaz contra esse sorogrupo (GIULIANI *et al.*, 2006).

Apesar da boa imunogenicidade conferida pelos polissacarídeos dos sorogrupos A, C, Y e W135, o polissacarídeo capsular da *N. meningitidis* do sorogrupo B, não produz uma resposta imune eficaz para proteger o hospedeiro contra as infecções por cepas desse sorogrupo. A estrutura do polissacarídeo capsular B (ácido  $\alpha$ 2-8-N-acetil ácido neuramínico) é análoga à estrutura de polissacarídeos encontrados nas células nervosas do tecido neural em desenvolvimento dos recém nascidos e em menor quantidade em adultos (FINNE *et al.*,1987). Por este motivo, essa estrutura não é reconhecida como antígeno pelo sistema imune do hospedeiro e este tipo de antígeno quando administrado pode induzir a formação de auto-anticorpos e a exacerbação de reações auto-imunes (SÁFADI & BARROS, 2006).

Desta forma, já foram realizados inúmeros estudos tentando acoplar proteínas carreadoras imunogênicas ao polissacarídeo B, mas até o momento ainda não existe uma vacina abrangente e eficaz contra esse sorogrupo (DANZIG, 2004). Com o objetivo de solucionar este problema, algumas estratégias de produção de vacina contra *N. meningitidis* sorogrupo B tem sido desenvolvidas (FRASCH *et al.*, 1994; BRUGE *et al.*, 2004). Tentou-se inicialmente adsorver o polissacarídeo B ao hidróxido de alumínio, adjuvante utilizado em produção de vacinas, porém os resultados não foram satisfatórios (FRASCH *et al.*, 1994). Em seguida tentou-se uma modificação química na estrutura do polissacarídeo, trocando o grupo N-acetil presente no carbono 5 do ácido siálico pelo grupo N- propionil e posterior ligação do polissacarídeo ao toxóide tetânico, tal estratégia também não apresentou resultados satisfatórios (BRUGE *et al.*,2004).



A partir desta busca, surgiu uma nova estratégia de preparações vacinais onde são utilizadas as proteínas de membrana externa como antígenos em associação ao LOS, formando vesículas chamadas OMV (*outer membrane vesicles*) ou vesículas de membrana externa (PIZZA *et al.*, 2000; JESSOURON *et al.*, 2004; KOEBERLING *et al.*, 2007).

Além disso, estudos da estrutura das proteínas da membrana externa, utilizadas como antígenos alternativos para a produção de vacinas demonstraram que bactérias de diferentes regiões são capazes de expressar proteínas com o mesmo peso molecular, mas com estrutura primária diferente. Desta maneira, a grande variabilidade estrutural destas proteínas representa mais um desafio para as estratégias de desenvolvimento de vacinas contra a *N. meningitidis* B, dificultando o desenvolvimento de uma vacina abrangente contra o sorogrupo B (MARTIN *et al.*, 2000; URWIN *et al.*, 2004; DE FILIPPIS, 2009).

Apesar destas dificuldades, algumas vacinas utilizando as OMPs foram desenvolvidas, testadas e levadas a uso clínico. No Brasil, na década de 90 foi utilizada a vacina produzida por Cuba, VaMengoc B+C® (Finlay Institute) baseada no sorotipo B4.P1.15, prevalente em Cuba. Embora este sorotipo também seja prevalente no Brasil, aqui existe uma variedade maior de outros sorosubtipos. Desta maneira os resultados obtidos com a vacinação ficaram abaixo do esperado, obtendo-se imunidade de apenas 74% da população vacinada (MILAGRES & MELLES, 1993; DE FILIPPIS, 2009; BARROSO *et al.*, 2010). Isso se explica pelo fato da resposta imune a essas vacinas ser específica para os sorotipos de meningococo B incluídos na vacina, impedindo que a proteção oferecida seja abrangente para outros sorotipos do meningococo (SÁFADI; BARROS, 2006; DE FILIPPIS, 2009).

Sendo assim, os custos para a produção de novas vacinas anti-meningocócicas são elevados e a produção de vacinas sob medida para cada foco não é uma boa opção para as autoridades de saúde. Por este motivo, a busca de uma vacina abrangente contra o sorogrupo B tem sido o alvo de investigação de vários grupos de pesquisa em todo o mundo (BERNARDINI *et al.*, 2007).

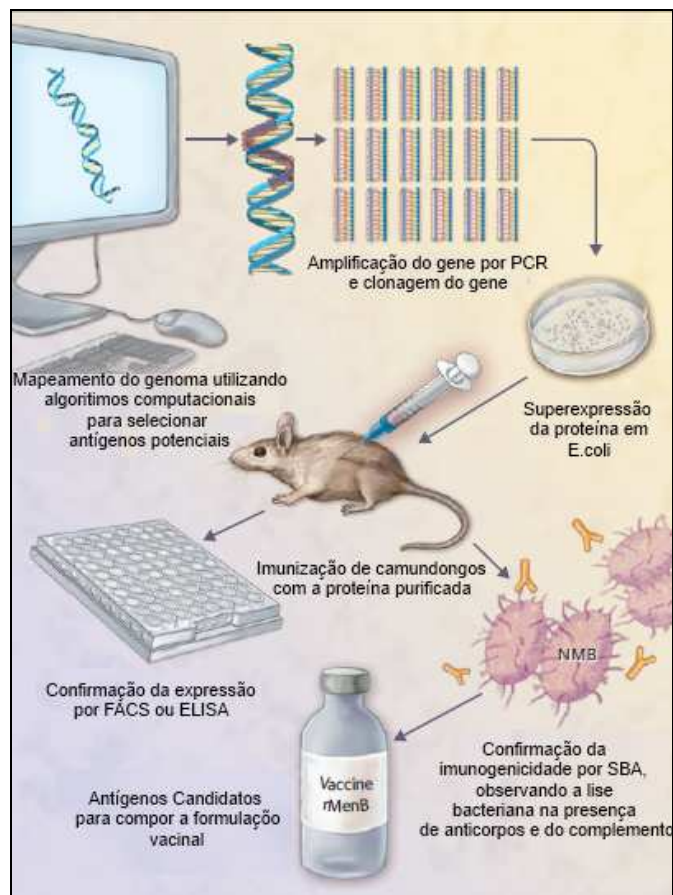
### 1.8.1.1. Vacinologia Reversa

No caso específico de *N. meningitidis* sorogrupo B, o advento de uma estratégia chamada vacinologia reversa foi muito importante na pesquisa de novos antígenos. Essa estratégia possibilitou a identificação de novas proteínas alvo para a produção de uma vacina que poderia prevenir as DM causadas por este sorogrupo (RAPPUOLI, 2000; PIZZA *et al.*, 2000; SETTE & RAPPUOLI, 2010).

O desenvolvimento de vacinas utilizando a abordagem da vacinologia reversa só é possível quando o genoma do patógeno se encontra sequenciado. O sequenciamento do genoma fornece uma espécie de catálogo de praticamente todos os antígenos protéicos que o patógeno pode expressar (RAPPUOLI, 2000). A determinação do genoma completo da *N. meningitidis* sorogrupo B por Tettelin *et al.*, (2000), forneceu informações essenciais para a pesquisa de uma vacina eficiente contra o meningococo B.

Por análise computacional (*in silico*), foram encontrados 600 novos antígenos. Trezentos e cinquenta desses antígenos, potencialmente localizados na superfície bacteriana, foram expressos em *Escherichia coli*, purificados e utilizados para imunizar camundongos. Os soros obtidos foram testados para verificar a presença de anticorpos bactericidas contra a *N. meningitidis*. Desses, 25 induziram a formação de anticorpos bactericidas. Muitos desses antígenos apresentaram sequências conservadas em uma população significativa de meningococos, sugerindo a possível indução de imunidade contra uma grande variedades de cepas heterólogas (RAPUOLLI, 2000; DE FILLIPIS, 2009; TAN *et al.*, 2010).

**Figura 5.** Aplicação da Vacinologia Reversa no desenvolvimento de vacinas contra infecções causadas por *N. meningitidis* sorogrupo B.

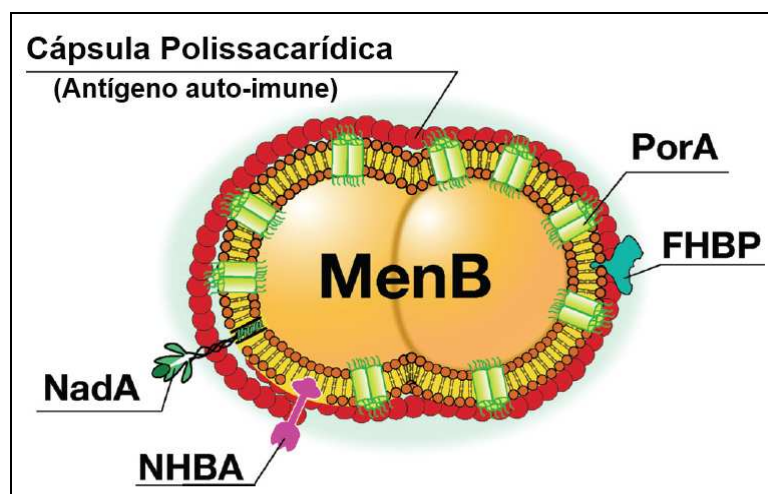


Fonte: (Adaptado de TAN *et al.*, 2010).

### 1.8.1.2. Antígenos vacinais promissores

Através da abordagem da vacinologia reversa foi possível identificar *in silico* proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* com potencial antigênico. As principais proteínas em estudo são fHbp, NadA e NHBA (PIZZA *et al.*, 2008; SERUTO *et al.*, 2010).

**Figura 6.** Figura esquemática de *N. meningitidis* sorogrupo B e os antígenos vacinais em estudo



Fonte: (adaptada de RAPPUOLLI, 2011)

#### 1.8.1.2.1. FHbp (*factor H binding protein*)

Uma das proteínas com maior potencial antigênico é a proteína ligante do fator H (fHbp, do inglês *factor H binding protein*), anteriormente denominada GNA1870 e lipoproteína 2086 (SCARSELLI *et al.*, 2008). É uma lipoproteína que está presente na membrana externa de todas as cepas de *N. meningitidis* e estimula a produção de anticorpos bactericidas (RAPPUOLI, 2000; MURPHY *et al.*, 2009). A universalidade de expressão e a alta imunogenicidade da proteína faz com que a fHbp seja atualmente o principal candidato a antígeno para preparações vacinais contra o meningococo sorogrupo B (PIZZA *et al.*, 2008; WELSCH & RAM, 2008;).

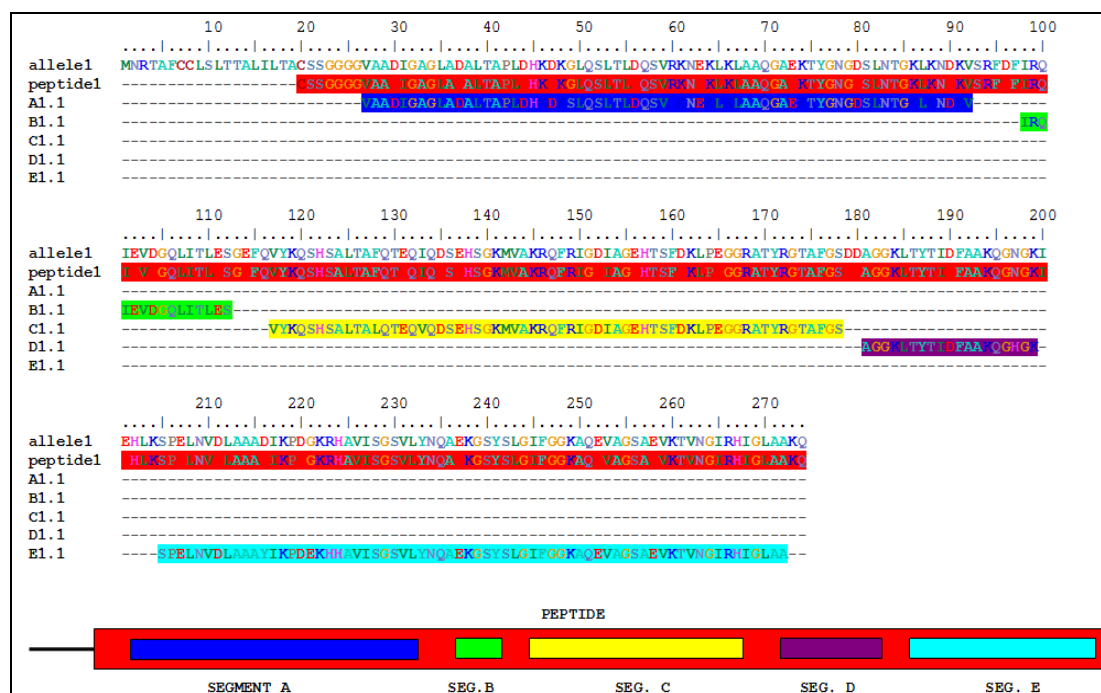
Como o seu nome já diz, a proteína fHbp se liga ao fator H impedindo assim a ação bacteriolítica da via alternativa do complemento, sendo este um importante mecanismo de sobrevivência e um fator de virulência da *N. meningitidis* (BEERNINK *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2009).

A fHbp é uma lipoproteína de aproximadamente 27 kD que possui 274 aminoácidos. Os 120 primeiros aminoácidos são conservados e os 154 próximos à região C-terminal apresentam maior variabilidade. A porção C-terminal apresenta vários epítomos que se ligam a anticorpos bactericidas (SCARSELLI *et al.*, 2008). De acordo com sua diversidade genética, a fHbp foi dividida em três variantes

denominados 1, 2 e 3 (classificação Novartis) ou famílias A e B (classificação Pfizer), onde a família A corresponde as variantes 2 e 3 e a família B corresponde a variante 1. De acordo com estudos, a variante 1 está presente em 80% e a variante 2 em 10% das cepas investigadas (GIULIANI *et al.*, 2006; KOEBERLING *et al.* 2007).

Estudos mostram que de uma maneira geral a fHbp possui uma estrutura modular que consiste na combinação de cinco segmento variáveis, cada um flanqueado por blocos de dois a cinco resíduos conservados de aminoácidos (BEERNINK *et al.*, 2006; BEERNINK *et al.*, 2009a) (figura 7). Uma vez que esta proteína estimula a produção de anticorpos bactericidas, supõe-se que a combinação dos genótipos I e II em uma vacina poderia proteger contra mais de 90% das cepas de todos os sorogrupos e sorotipos (BEERNINK *et al.*, 2006, DE FILIPPIS, 2009). Uma vacina combinando duas variantes de fHbp já se encontra em ensaios clínicos (PIZZA *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2010).

**Figura 7.** Alelo 1 de fHbp. Exemplo da composição de um alelo, onde cinco segmentos formam o peptídeo principal. A variabilidade destes segmentos levam a caracterização de um novo alelo.



#### **1.8.1.2.2. NadA (*neisserial adhesin A*)**

NadA (*neisserial adhesin A*) é uma adesina que possui homologia com uma família de proteínas envolvidas com o processo de invasão e patogenicidade. NadA é capaz de induzir uma forte resposta bactericida e se mostrou protetora através do processo de imunização passiva em modelos animais. Sabe-se que o gene *nadA* está presente em aproximadamente 50% dos isolados patogênicos de *N. meningitidis*, e é mais frequentemente associado a cepas pertencentes a clones hipervirulentos, pois está presente em quase todas as cepas pertencentes aos complexos clonais cc32, cc11 e cc8. Porém está ausente nas cepas do complexo clonal ST-41/44, em *Neisseria gonorrhoeae* e em espécies comensais como *Neisseria lactamica* e *Neisseria cinerea* (COMANDUCCI *et al*, 2002; COMANDUCCI *et al*, 2004; CAPECCHI *et al*, 2005).

Cinco formas bem conservadas de NadA foram descritas (NadA-1, NadA-2 e NadA-3, NadA-4 e NadA-5). As formas NadA-1, NadA-2 e NadA-3 foram identificadas de isolados clínicos e possuem a característica de reação cruzada de seus anticorpos, ou seja, anticorpos contra cada forma são igualmente bactericidas contra as outras formas da proteína. A proteína NadA se apresenta de forma diferente nas cepas isoladas de indivíduos saudáveis, onde apenas a forma NadA-4 foi identificada. Uma outra forma mais próxima da NadA-4 é a NadA-5 que foi associada apenas às cepas pertencentes ao cc213. Essas duas formas tem em comum a baixa ou ausente capacidade de conferir reatividade cruzada com as outras formas de NadA, já que anticorpos contra estas formas não são bactericidas contra as demais variantes de NadA (COMANDUCCI *et al*, 2004; BAMBINI *et al*, 2009; LUCIDARME *et al*, 2010).

#### **1.8.1.2.3. NHBA (*Neisserial Heparin-Binding protein*)**

*Neisserial Heparin-Binding protein* (NHBA), inicialmente chamada GNA 2132, é uma proteína identificada por Pizza e colaboradores (2000) durante o projeto de seqüenciamento do genoma da cepa MC58 de *N. meningitidis* sorogrupo B. O gene foi identificado em 31 isolados geneticamente diferentes de *N. meningitidis*,

sendo detectado também em *N. lactamica* e *N. gonorrhoeae* (PIZZA *et al.* 2000; SERUTO *et al.*, 2010).

NHBA é uma lipoproteína presente em quase todos os isolados de *N. meningitidis* e tem como função recrutar a heparina para a superfície da célula aumentando assim a resistência ao soro sendo esse mais um fator de virulência do meningococo. Estudos demonstraram que NHBA foi capaz de induzir anticorpos bactericidas específicos. A identidade entre os aminoácidos das subvariantes de NHBA é cerca de 54%, no entanto apresentaram bons níveis de resposta imunológica tendo em vista a reatividade cruzada entre elas. Essa característica reforça a importância da inclusão deste antígeno em uma vacina meningocócica multicomponente (WELSH *et al.*, 2003; JACOBISSEON *et al.*, 2006; SERUTO *et al.*, 2010).

### **1.8.1.3. Vacinas em ensaios clínicos**

#### **1.8.1.3.1. Vacina rFHbp bivalente (Pfizer)**

Uma vacina experimental contendo a proteína fHbp como único antígeno foi desenvolvida pela Pfizer e se encontra ensaios clínicos de Fase II (PIZZA *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2010). A vacina é bivalente pois contém uma variante a partir de cada subfamília, A (variantes fHBP 2/3) e B (fHBP variante 1), que tem, portanto, o potencial para ampla cobertura, e obteve respostas com anticorpos bactericidas em 22-100% dos adultos num estudo de Fase I (PIZZA *et al.*, 2008; BAI & BORROW, 2010; JIANG *et al.*, 2010). Sendo as crianças as maiores afetadas pela doença meningocócica, estudos com essa população estão em desenvolvimento.

#### **1.8.1.3.2. Vacina multicomponente 4CMenB (Novartis)**

Para desenvolver uma vacina com uma maior cobertura contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, foram combinadas diversas proteínas de membrana externa como fHbp v.1(variante 1), NadA, e NHBA (variante 2). Estas proteínas foram também combinadas com OMVs da cepa epidêmica de Nova Zelândia NZ98/254 (P1.7-2.4), formando assim a vacina multicomponente meningocócica contra o

sorogrupo B 4CmenB (FINDLOW *et al.*, 2010; GOSSGER *et al.*, 2012; TONEATO *et al.* 2011).

Para facilitar a fabricação, fHbp v.1.1 e NHBA v.2 foram fusionadas a outras proteínas chamadas GNA2091 e GNA1030, respectivamente. As funções de GNA 2091 e 1030 ainda não foram bem estabelecidas, mas esse acoplamento aumenta a estabilidade e imunogenicidade de fHbp e NHBA (FINDLOW *et al.*, 2010; PRINCIPI & ESPÓSITO, 2011). A vacina 4CMenB está sendo desenvolvida pela Novartis e já se encontra em ensaios clínicos. É constituída de 50 µg de cada proteína (fHbp v.1, NadA, e o NHBA v.2), 25 µg de OMV destoxificada da cepa NZ98/254, 1,5 mg de hidróxido de alumínio, e 10 mM de histidina em 0,5 mL de água para injeção (GOSSGER *et al.* 2012). No estudo multicêntrico de fase 2, participaram 1885 crianças e a vacina se mostrou imunogênica e bem tolerada, inclusive quando administrada juntamente com vacinas do calendário vacinal.

### **1.9. A Vigilância Sanitária e o controle da qualidade de vacinas**

A gravidade das doenças meningocócicas, a ocorrência de epidemias e a possibilidade da disseminação de cepas virulentas ou resistentes aos antibióticos, fazem com que a prevenção através de vacinas efetivas e de baixo custo seja considerada uma das prioridades em saúde pública (GRECO, 2002). Desta maneira, o controle da qualidade dessas vacinas constitui um instrumento para a saúde pública de grande importância (PONTE, 2003).

Com a reforma sanitária Brasileira e o surgimento do Sistema Único de Saúde (SUS), a questão de insumos (medicamentos, imunobiológicos, hemoderivados e equipamentos médico-hospitalares), adquire uma importância crescente (BRASIL, 1990). É responsabilidade das autoridades sanitárias nacionais assegurar que os imunobiológicos disponíveis no Brasil, de produção nacional ou não, sejam seguros, de qualidade e eficácia comprovadas (BRASIL, 1976).

Dois dos motivos que levam a preocupação com a qualidade desses produtos são o fato de que as vacinas são aplicadas em grupos de pessoas saudáveis e o fato de que as campanhas expõem toda uma faixa etária da população ao produto. Diante deste contexto, a vigilância sanitária voltada para os imunobiológicos apresenta uma grande importância no cenário mundial. No Brasil, todas as vacinas utilizadas pelo



Programa Nacional de Imunizações (PNI), são analisadas pelo INCQS, um dos objetivos principais do PNI é oferecer todas as vacinas com qualidade a todas as crianças que nascem anualmente em nosso país, tentando alcançar coberturas vacinais de 100% de forma homogênea.

Sendo assim, o controle da qualidade lote a lote destes produtos faz parte das atividades do INCQS, onde são realizados os ensaios de controle preconizados por normas nacionais e internacionais e de acordo com os resultados, emite-se o laudo analítico (BRASIL, 2008).

Com relação às vacinas antimeningocócicas produzidas a partir de polissacarídeos purificados contra aos sorogrupos A, C Y e W135, existe consenso internacional com relação aos ensaios a serem realizados, a fim de garantir a qualidade final do produto. Porém ainda falta consenso internacional com relação aos ensaios empregados no controle da qualidade de vacinas antimeningocócicas conjugadas, no controle de vacinas antimeningocócicas sorogrupo B produzidas a partir de OMVs, e também daquelas que são compostas por um único ou vários antígenos protéicos (WHO, 2006).

Embora nenhuma conclusão sobre novos parâmetros tenha sido proposta e apesar da vacina antimeningocócica B não ter sido mencionada nas recomendações da Organização Mundial de Saúde, esta discussão aponta a necessidade da atualização dos ensaios a serem empregados no controle da qualidade de vacinas antimeningocócicas produzidas por novas tecnologias.

Diante das novas tecnologias de produção de vacinas, em busca de novos antígenos cada vez mais ativos e com menos reações adversas, é papel do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, representado pelo INCQS, estar preparado para dar respostas tecnicamente satisfatórias às demandas geradas por estes novos produtos.

### **1.10. Relevância do estudo**

A doença meningocócica é considerada uma doença de grande impacto na saúde da população mundial, pois embora existam terapias à base de antimicrobianos, as taxas de morbidade e mortalidade ainda permanecem altas e a vacinação continua sendo a melhor estratégia de controle da doença.

Diante dos avanços tecnológicos e da demanda por respostas que sejam capazes de assegurar a qualidade dos produtos analisados, a questão do controle das vacinas contra a meningite meningocócica torna-se uma preocupação cada vez maior.

Por se tratar de uma nova categoria de vacinas anti-meningocócicas, ainda não existe monografia nos compêndios oficiais descrevendo os ensaios a serem realizados. No Brasil, cabe ao INCQS desenvolver métodos sensíveis e precisos na detecção de antígenos e na avaliação da qualidade das preparações vacinais, de modo a garantir a efetividade do imunobiológico.

Embora, os antígenos protéicos das vacinas anti-meningocócicas em desenvolvimento sejam relativamente conservados, os mesmos já demonstraram em estudos a presença de variabilidade em algumas regiões. Logo é fundamental a realização de estudos sobre a prevalência destas variantes, para que se possa garantir a presença de antígeno na preparação vacinal e assim sua eficácia (JACOBSSON *et al.*, 2006; LUCIDARME *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a prevalência e a diversidade genética dos candidatos a antígenos vacinais presentes em duas vacinas NmB em desenvolvimento em isolados clínicos de *N. meningitidis* sorogrupos B e C do Brasil.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os isolados por método molecular utilizando a técnica de MLST e pelo sequenciamento dos genes *porA* e *fetA*;
- Avaliar a prevalência e variabilidade genética dos antígenos por meio dos genes *fHbp*, *nadA* e *nhbA*;
- Comparar as subvariantes dos antígenos encontradas com aquelas presentes nas preparações vacinais em desenvolvimento;
- Determinar possível troca de cápsula (*capsule switching*) entre os isolados.
- Determinar as relações filogenéticas dos isolados correlacionando os complexos clonais com as variantes antigênicas e sorogrupos.
- Estimar com base nos dados obtidos o impacto destas vacinas frente à distribuição e variabilidade destes antígenos nas cepas estudadas.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Seleção das linhagens para o estudo**

As cepas bacterianas, que foram utilizadas no presente estudo, fazem parte da Coleção de Pesquisa do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram selecionadas para análise 220 cepas de *N. meningitidis* sorogrupos B e C isoladas no período 2003 a 2011 de casos clínicos de DM em crianças e adultos de cinco estados do Brasil (Amazonas, Bahia, Pernambuco, Santa Catarina e Rio de Janeiro). Estas cepas se encontram conservadas por liofilização no Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR).

#### **3.2. Condições de cultivo dos meningococos**

As cepas liofilizadas foram ressuspendidas em caldo TSB e semeadas em meio de cultura ágar chocolate constituído por uma base de ágar Mueller-Hinton (Oxoid) aquecida a 70°C, adicionado de 10% de sangue de cavalo ou coelho desfibrinado e estéril. A incubação da placa de ágar chocolate foi feita em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 18 horas.

##### **3.2.1. Extração e purificação do DNA genômico**

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de uma suspensão de aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL de *N. meningitidis*. As células bacterianas foram processadas usando o kit de extração e purificação Dneasy tissue 250 (Qiagen Inc. Valencia, Calif) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi eluído em um volume de 200 µL de tampão específico da Qiagen e armazenado a -20°C para ser utilizado posteriormente nos experimentos.

### 3.2.2. Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação foi realizada em volume de 25 $\mu$ L contendo: 9,5  $\mu$ L de água para PCR, 12,5  $\mu$ L Master Mix (Promega), 1  $\mu$ L de iniciador “*foward*” e 1  $\mu$ L de iniciador “*reverse*” ambos com concentração de 50 pmoles. Os programas e iniciadores utilizados nas reações da PCR estão descritos na tabela 3.

Para a visualização dos fragmentos amplificados, 5  $\mu$ L do produto da PCR foram separados por eletroforese a 80 volts, por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, em gel de agarose a 1% com com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/ml), em cuba de eletroforese horizontal, utilizando tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Os fragmentos de DNA foram visualizadas sobre luz UV e digitalizados com o ImageQuant 300 GE. Os produtos da PCR foram purificados para retirada de resíduos de iniciadores utilizando o kit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase com Exonuclease - USB), seguindo as orientações do fabricante.

**Tabela 3:** Iniciadores empregados para a caracterização de genes que codificam antígenos de *Neisseria meningitidis*.

Iniciadores	Programa	Gene alvo	Produto (bp)	Referência
Mur-F† 5' - CTATTCTGCGTATGACTAGGAG -3' Mur-R† 5' - GTCCGAACGGTAAATTATCGTG -3'	95° C – 5 min. 95° C – 50 seg. ┌ 56° C – 50 seg. 35x 72° C – 50 seg. └ 72° C – 7 min.	Gene <i>fHbp</i>	899	Murphy <i>et al.</i> , 2009
Gna 2132-F† 5' - GGCGTTCAGACGGCATATTTTTACA-3' Gna 2132-R† 5' - GGTTTATCAACTGATGCGGACTTGA-3'	95° C – 5 min. 95° C – 1 min. ┌ 52,5° C – 1 min. 35x 72° C – 1 min. └ 72° C – 5 min.	Gene <i>nhbA</i>	1454-1782	Jacobsson <i>et al.</i> , 2006
Gna 2132-S2* 5' - GCGGACACGCTGTCAAACC-3' Gna 2132-S8* 5' - CCTCGACCGTGCAGAACGCC-3'				Jacobsson <i>et al.</i> , 2006
PorA-210† 5' - ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTC - 3' PorA-211† 5' - AATGAAGGCAAGCCGTCAAAAACA - 3'	95° C – 5 min. 95° C – 30 seg. ┌ 56° C – 1 min. 40x 72° C – 2 min. └ 72° C – 5 min.	Gene <i>porA</i>	1200	Feavers <i>et al.</i> , 1998
NadA-A1† 5' - GTGGACGTACTCGACTACGAAGG -3' NadA-B2† 5' - CGAGGCGATTGTCAAACCGTTC-3'	95° C - 1 min. 95 °C – 30 seg. ┌ 56,5° C – 30 seg. 35 72° C – 1,30 min. └ 72° C – 5 min.	Gene <i>nadA</i>	1977	Comanducci <i>et al.</i> , 2004
FetA-S1† 5' - CGGCGCAAGCGTATTCGG -3' Fet-S8† 5'-CGCGCCCAATTCGTAACCGTG -3'	95° C - 5 min. 94° C – 1min. ┌ 50° C – 1min. 35x 72° C – 2min. └ 72° C – 10min.	Gene <i>fetA</i>	1159	Thompson <i>et al.</i> , 2003

† iniciadores para PCR e sequenciamento; \* iniciadores para o sequenciamento

### 3.2.3. Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos da PCR dos genes incluídos no estudo, foi realizado seguindo metodologia padrão utilizando o sequenciador automático 48-Capilar ABI3730 Genetic Analyzer Sequencer (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ) utilizando o Big Dye Terminator sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para marcação das bases nitrogenadas. As seqüências obtidas foram

transformadas em arquivo FASTA para serem analisadas, utilizando os programas Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation) e BioEdit 7.0 (freeware) (HALL, 1999).

### 3.3. Determinação das Variantes dos antígenos vacinais

FHbp é uma lipoproteína presente na membrana externa de *N. meningitidis*. O gene *fHbp* possui uma variabilidade genética que classifica esse gene em três variantes (1,2 e 3) ou duas famílias (A e B), de acordo com nomenclatura criada pela Novartis ou pela Pfizer respectivamente. A família A (Pfizer) compreende as variantes 2 e 3 (Novartis) e a família B compreende a variante 1.

Para este estudo, selecionamos um par de iniciadores descrito por Murphy e colaboradores (2009), específico para as regiões conservadas do gene possibilitando a amplificação de todas as variantes. Para determinar as variantes da proteína fHbp, as sequências obtidas foram convertidas para o formato FASTA utilizando o programa Sequencher 5.0 Após a obtenção dos arquivos neste formato, as sequências foram alinhadas no programa BioEdit 7.0, utilizando sequências de referência para cada uma das três variantes descritas desta proteína.

As sequências de *fHbp* foram submetidas ao banco de dados Neisseria Sequence Typing Home Page (<http://pubmlst.org/neisseria/fHbp/>), que atribuiu uma variante e um alelo específico para cada sequência. A combinação da variante com o número atribuído ao alelo determina a subvariante da proteína FHBP.

Apesar de também ser classificada em subvariantes como a fHbp, a proteína NHBA difere pela atribuição ser feita de maneira mais simples, pois a determinação é feita apenas pela atribuição do alelo, que também dá nome a esta subvariante. As sequências de *Nhba* foram submetidas ao banco de dados Neisseria Sequence Typing Home Page (<http://pubmlst.org/neisseria/fHbp/>), que atribuiu os alelos do gene.

#### 3.3.1. Análise filogenética dos antígenos vacinais

As sequências de nucleotídeos dos genes dos antígenos vacinais *fHbp*, *NHBA* foram submetidas a análise filogenética por "Split Decomposition" através do programa SplitsTree 4 (HUSON & BRYANT, 2006). Nessa análise, as relações

filogenéticas entre diferentes isolados são determinadas construindo-se uma rede filogenética *unrooted* (não enraizada) a partir de sequências de nucleotídeos previamente alinhadas usando os métodos de "neighbor-net" e redes de recombinação genética.

### **3.4. Caracterização dos isolados pelos genes *porA* e *fetA***

A diversidade e dinâmica das populações de *N. meningitidis* faz com que um esquema de tipificação com alta resolução, fácil compreensão e reprodutibilidade seja de grande importância para a vigilância epidemiológica da doença meningocócica. Com esse objetivo, Jolley e colaboradores (2007) desenvolveram uma nomenclatura baseada no sequenciamento de regiões variáveis dos genes das proteínas de membrana PorA e FetA e na determinação dos tipos sequenciais (ST) atarvés do método de MLST. Utilizamos esta nomenclatura para a caracterização dos isolados deste estudo que é recomendada pela European Meningococcal Disease Society (EMGM) - <http://neisseria.org/nm/typing/>.

#### **3.4.1. Determinação das Regiões Variáveis (VR) de PorA**

As regiões variáveis 1 e 2 (VR1 e VR2) de PorA correspondem às alças mais proeminentes da proteína (alças I e IV, respectivamente). Estas VRs são responsáveis pela classificação de *N. meningitidis* em sorosubtipos (DE FILIPPIS, 2007; STEFANELLI *et al.*, 2009; FAZIO *et al.*, 2010).

Para a caracterização genotípica de PorA um número de variante deve ser determinado para cada VR. Para atribuir uma variante a VR1 e VR2, as sequências de nucleotídeos de *porA* foram submetidas ao banco de dados PorA Variable Region Database (<http://neisseria.org/nm/typing/pora/>). Existem hoje depositados nesse banco de dados, 10 famílias para VR1 e 20 para VR2. Cada uma dessas famílias apresenta um número de variantes que vai de 233 (VR1) a 632 (VR2) alelos diferentes.

A VR3 é um método complementar para a subtipificação de *N. meningitidis*. Esta VR corresponde a alça V da proteína, que é um pouco mais curta que as alças I

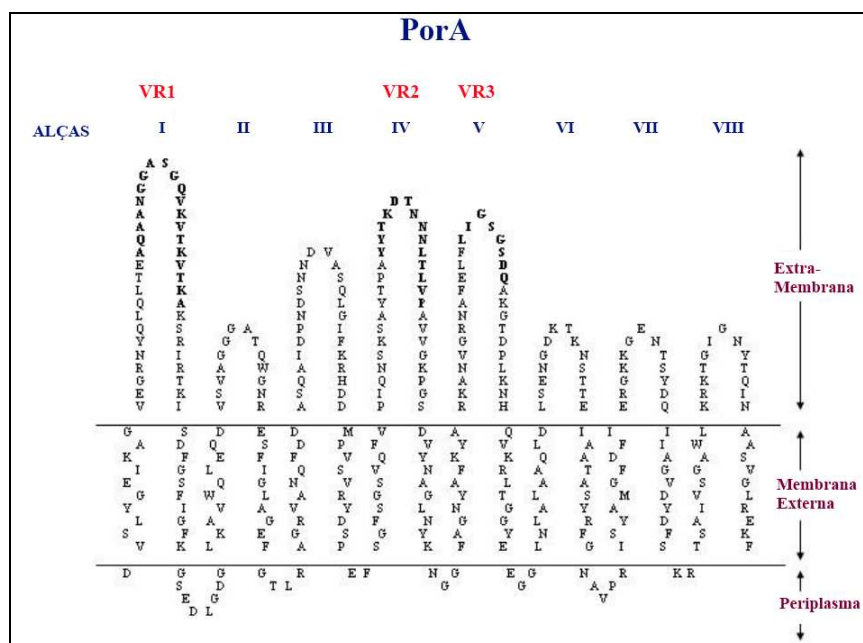


(VR1) e IV (VR2), como demonstrado na figura 9, porém sua interação com o sistema imune do hospedeiro mostra um importante nível de imunogenicidade (OOMEN *et al.*, 2003). Devido a sua baixa variabilidade genética, VR3 pode ser um alvo alternativo de PorA para a concepção de uma nova vacina (CLARK, *et al.*, 2003; DE FILIPPIS *et al.*, 2007).

Atualmente existem 14 variantes de VR3 caracterizadas, utilizando o método descrito por Molling e colaboradores (2000) e posteriormente modificado por Clarke e colaboradores (2003). O método baseia-se em (a) tradução da sequência de nucleotídeos em sequência de peptídeos, (b) alinhamento da sequência de peptídeos com o grupo de variantes anteriormente descritas, (c) determinação da variante com 100% de similaridade (DE FILIPPIS *et al.*, 2007; DIGGLE & CLARKE, 2003).

Para a determinação da VR3 de PorA, as sequências foram submetidas ao banco de dados *Neisseria meningitidis* PorA VR3 Database (<http://exon.niaid.nih.gov/meningitidis/index.html>) (DE FILIPPIS, 2011). Para a VR3, o banco de dados específico, registra 12 variantes até o momento.

**Figura 8.** Topologia dos aminoácidos da proteína porina A, PorA, e suas regiões variáveis (adaptado de VAN DER LEY *et al.*, 1991).



### 3.4.2. Determinação das Regiões Variáveis de FetA (FetA VR)

O sequenciamento representativo do gene *fetA* de isolados de meningococos e dedução da sequência dos peptídeos, possibilitou que um modelo de tipificação de FetA fosse proposto, predizendo 13 alças na superfície de *N.meningitidis*, que são potencialmente expostos ao sistema imune (THOMPSON, 2001). Uma dessas alças (alça VII) é variável entre todos os isolados, correspondendo a uma única região variável (FetA VR). Atualmente, os peptídeos de FetA podem ser classificados em 9 famílias com 392 variantes e essa diversidade faz com que este gene seja adequado para a utilização como marcador molecular de *N. meningitidis* (THOMPSON *et al.*, 2003; JOLLEY *et al.*, 2007).

As sequências de *fetA* foram submetidas ao banco de dados *Neisseria FetA Variable Region Typing* (<http://pubmlst.org/neisseria/FetA/>), para a determinação de suas identificamos as regiões variáveis (FetA VR).

## 3.5. MLST

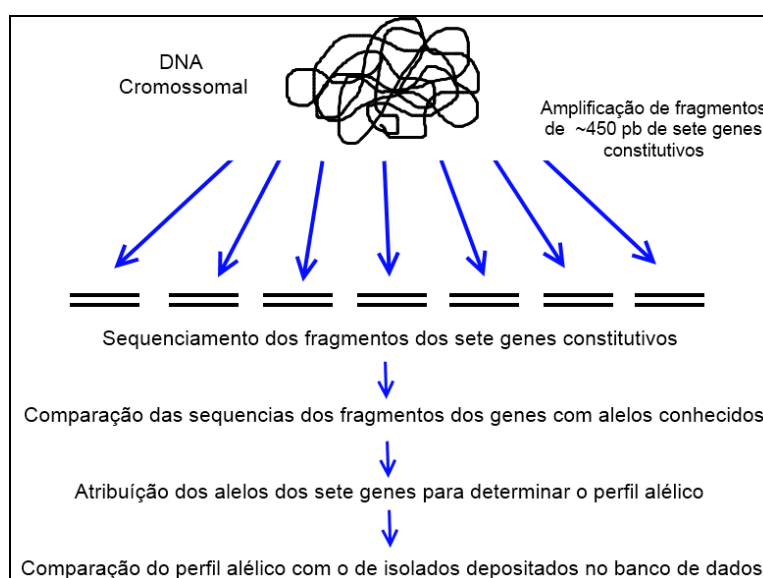
### 3.5.1. Amplificação e sequenciamento dos genes

MLST (Multilocus sequence typing) é um método de caracterização dos isolados de espécies bacterianas usando as sequências de fragmentos internos de 7 genes constitutivos chamados *housekeeping*. São utilizados fragmentos de aproximadamente 450-500 bp, uma vez que estes podem ser precisamente sequenciados em ambas as fitas usando um sequenciador automatizado. As sequências obtidas devem ser reduzidas ao comprimento específico de cada gene e submetidas ao *Neisseria MLST Database* em <http://pubmlst.org/neisseria/>, para a atribuição dos alelos específicos de cada gene.

A combinação dos alelos dos sete genes define o perfil alélico ou tipo sequencial (ST). Caso um ou mais alelos não seja determinado pelo banco de dados com matching de 100%, esse deverá ser considerado um novo alelo. A determinação de um novo alelo é exclusiva dos curadores do banco de dados de MLST para os quais deverão ser enviados os cromatogramas de ambas as fitas para a determinação

única do alelo. A combinação dos alelos também pode resultar em um ST novo quando não houver *matching* com um ST já depositado no banco de dados. Nesse caso, basta submeter ao banco a combinação encontrada para a descrição de um novo ST pelos curadores. A associação dos novos STs a possíveis complexos clonais é realizada rotineiramente pelos sistemas do banco de dados e pode demorar de 1 a 3 dias após a determinação do novo ST (figura 8).

**Figura 9.** Esquema das etapas da metodologia utilizada para MLST .



Os sete genes utilizados no esquema do MLST de *N. meningitidis* são *abcZ*, *adk*, *aroE*, *FumC*, *gdh*, *pdh* e *pgm* de acordo com o site *Neisseria MLST Database* em <http://pubmlst.org/neisseria/> . Os iniciadores para a amplificação e sequenciamento dos fragmentos dos genes estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4:** Descrição dos genes e seus respectivos iniciadores utilizados em MLST de *Neisseria meningitidis*.

Gene	Nome completo	Iniciadores		Produto (pb)
<i>abcZ</i>	ABC transporter ATP-binding protein	Amplif.	abcZ-P1C 5'-TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC-3'	898
			abcZ-P2C 5'-TCCCCGTCGTA AAAACAATC-3'	
		Seq.	abcZ-S1 5'-AATCGTTTATGTACCGCAGR-3'	433
			abcZ-S2 5'-GAGAACGAGCCGGGATAGGA-3'	
<i>Adk</i>	adenylate kinase	Amplif.	Adk-P1B 5'-CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC-3'	708
			adk-P2B 5'-TGCCAATGCGCCAATAC-3'	
		Seq.	adk-S1A 5'-AGGCWGGCAGCCCTTGG-3'	465
			adk-S2 5'-CAATACTTCGGCTTTACGG-3'	
<i>aroE</i>	shikimate dehydrogenase	Amplif.	aroE-P1B 5'-TTTGAACAGGCGTTGCGG-3'	835
			aroE-P2B 5'-CAGCGTAATCCAGTGCGAC-3'	
		Seq.	aroE-S1A 5'-GCGGTCAAAYACGCTGRTK-3	490
			aroE-S2 5'-ATGATGTTGCCGTACACATA-3	
<i>fumC</i>	fumarate hydratase class II	Amplif.	fumC-P1B 5'-TCCCCGCGTAAAAGCCCTG-3'	860
			fumC-P2B 5'-GCCCGTCAGCAAGCCCAAC-3'	
		Seq.	fumC-S1 5'-TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG-3	465
			fumC-S2 5'-TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC-3	
<i>Gdh</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Amplif.	gdh-P1B 5'-CTGCCCCGGGGTTTTTCATCT-3'	677
			Gdh-P2B 5'-TGTTGCGCGTTATTCAAAGAAGG-3'	
		Seq.	gdh-S3 5'-CCTTGCAAGAAAGCCTGC-3'	501
			gdh-S4C 5'-RCGCACGGATTCATRYGG-3	
<i>pdhC</i>	pyruvate dehydrogenase	Amplif.	pdhC-P1B 5'-CCGGCCGTACGACGCTGAAC-3	818
			pdhC-P2B 5'-GATGTCGGAATGGGGCAAACA-3'	
		Seq.	pdhC-S1 5'-TCTACTACATCACCTGATG-3'	480
			pdhC-S2 5'-ATCGGCTTTGATGCCGATTTT-3'	
<i>Pgm</i>	Phosphoglycerate mutase	Amplif.	pgm-P1 5'-CTTCAAAGCCTACGACATCCG-3'	1339
			pgm-P2 5'-CGGATTGCTTTTCGATGACGGC-3'	
		Seq.	pgm-S1 5'-CGGCGATGCCGACCGCTTGG-3'	450
			pgm-S2A 5'-GGTGATGATTTCCGGTYGCRCC-3'	

A amplificação foi realizada em volume de 25µL contendo: 9,5 µL de água para PCR, 12,5 µL Máster Mix (Promega), 1 µL de iniciador *foward* e 1 µL de iniciador *reverse* ambos a 50 pmoles. Após um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, foram realizados 30 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguido de um ciclo adicional de extensão de 72°C por 5 min em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.).

Cinco  $\mu\text{L}$  dos fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 80 volts, por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, em gel de agarose (Sigma Aldrich, MO, USA) contendo 0,5  $\mu\text{g/mL}$  brometo de etídio (Promega) (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), em cuba de eletroforese horizontal, utilizando tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Os fragmentos de DNA foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentadas. Os produtos da PCR foram purificados para retirada de resíduos de iniciadores utilizando o kit SAP kit (Shrimp Alkaline Phosphatase e Exonuclease - USB), seguindo as orientações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado conforme metodologia padrão já descrita anteriormente.

### **3.5.2. Análise das sequências**

Para determinar os alelos dos respectivos genes do MLST, os arquivos obtidos do sequenciamento foram convertidos para o formato FASTA utilizando o programa Sequencher 5.0. Essas sequências foram submetidas ao banco de dados Neisseria MLST Database (<http://pubmlst.org/neisseria>) onde foram obtidos os alelos dos sete genes para cada cepa. A combinação dos alelos foi submetida novamente ao banco para a adeterminação do tipo sequencial (ST) de cada isolado. Os STs obtidos foram associados a complexos clonais (CC) pelo próprio banco de dados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização das amostras

Neste estudo as amostras foram agrupadas de acordo com o sorogrupo, região geográfica (estado), quantidade e o ano do isolamento, conforme apresentado na tabela 5.

As 222 amostras foram classificadas de acordo com o sorogrupo onde 88 (39,6%) foram do sorogrupo B e 134 (60,4%) do sorogrupo C. O período do estudo foi de 2003 a 2011. Cinco estados brasileiros foram representados nesta pesquisa, Amazonas (AM), Bahia (BA), Pernambuco (PE), Rio de Janeiro (RJ) e Santa Catarina (SC). O maior número de isolados foi do estado de Pernambuco (n=102/50,4%), seguido da Bahia (n=65/29,3%), Rio de Janeiro (n=23/10,4%), Amazonas (n=18/8,1%) e Santa Catarina (n=4/1,8%).

Os isolados de Pernambuco e do Rio de Janeiro apresentaram uma distribuição por sorogrupo equilibrada, onde a proporção NmB/NmC foi de 52,2% / 47,8% e 48,2% / 51,8% respectivamente. Já os isolados do Amazonas, da Bahia e de Santa Catarina foram relacionados a apenas um sorogrupo, sendo AM (n=18) e SC (n=4) do sorogrupo B e BA (n=65) todos do sorogrupo C.

**Tabela 5.** Distribuição e classificação das cepas *N.meningitidis* estudadas.

Ano	RJ (n=23/10,4%)		PE (n=112/50,4%)		AM (n=18/8,1%)		BA (n=65/29,3%)		SC (n=4/1,8%)		Total (%)
	NmB	NmC	NmB	NmC	NmB*	NmC*	NmB*	NmC*	NmB*	NmC*	
2003	1		4						4		9 (4,1)
2004	1		6		18						25 (11,3)
2005	1										1 (0,4)
2006	2	1	15	4							22 (9,9)
2007	1	1	11	2							15 (6,8)
2008	1	2	9	14			34				60 (27)
2009	4	1	4	22			31				62 (27,9)
2010		6	4	12							22 (9,9)
2011	1		1	4							6 (2,7)
Total	12	11	54	58	18		65		4		222 (100)
(%)	(52,2)	(47,8)	(48,2)	(51,8)	(100)		(100)		(100)		

\* Estados onde foram identificadas cepas de apenas um sorogrupo

#### 4.2. Caracterização dos Isolados por MLST

Foram encontrados 6 complexos clonais presentes nos isolados deste estudo. Das 222 cepas, analisadas 93 pertencem ao CC ST-103, o que representa 42% de todos os isolados, onde 92 sorogrupo C (99%) e apenas uma cepa sorogrupo B (1% - P2961). O CC ST-11/ET-37 foi identificado em doze isolados (5,4%), sendo onze (92%) NmC e uma (8%) NmB. Oitenta isolados (36%) foram identificados como pertencentes ao CC ST-32/ET-5, onde 70 (87,5%) sorogrupo B e 10 (12,5%) sorogrupo C. Os CCs ST-41/44 e ST-1136 se mostraram exclusivos ao sorogrupo B e apresentaram quatro (2%) e três (1,5%) isolados, respectivamente. O CC ST-8/A4 foi identificado em sete isolados (3%), todos sorogrupo C. Vinte e três cepas não tiveram o CC determinado, representando 10,3% dos isolados, sendo 9 (39%) NmB e 14 (61%) NmC.

Para o sorogrupo B, o CC ST-32/ET-5 foi o mais representativo, onde 79,5% dos isolados deste sorogrupo foram classificados neste complexo clonal. ST-1136 e ST-41/44 foram identificados em 3,5% e 4%, respectivamente. Os CCs ST-11/ET-37 e ST-103 foram identificados em apenas um isolado cada, o que representa aproximadamente 1% do total de NmB. Já nos isolados sorogrupo C, o CC predominante foi o ST-103, que corresponde a 68,7%. Os CCs ST-11/ET-37, ST-8/A4 e ST-32/ET-5 foram identificados em 8,2%, 5,2% e 7,5% dos isolados NmC, respectivamente (tabela 6).



**Tabela 6.** Isolados estratificados por complexo clonal (CC) e sorogrupo.

CC	n	%	NmB			NmC		
			n	%NmB	%CC	n	%NmC	%CC
ST-11/ET-37	12	5,4%	1	1,0%	8,0%	11	8,2%	92,0%
ST-8/A4	7	3,0%	0	-	-	7	5,2%	100,0%
ST-32/ET-5	80	36,0%	70	79,5%	87,5%	10	7,5%	12,5%
ST-41/44	4	1,8%	4	4,5%	100,0%	0	-	-
ST-103	93	42,0%	1	1,0%	1,0%	92	68,7%	99,0%
ST-1136	3	1,5%	3	3,5%	100,0%	0	-	-
ND	23	10,3%	9	10,5%	39,0%	14	10,4%	61,0%
<b>Total</b>	222	100,0%	88	100,0%	-	134	100,0%	-

NmB % e NmC %: Incidência do CC dentro de cada sorogrupo. NmB %CC e NmC %CC: Incidência do CC por sorogrupo.

### 4.3. Caracterização dos isolados pelos genes *porA* e *fetA*

#### 4.3.1. PorA

##### 4.3.1.1. Região Variável 1 de PorA (VR1)

Analisando as regiões variáveis de PorA isoladamente, a VR1 apresentou 16 variantes diferentes. Destes, onze variantes foram identificadas em apenas um (3 variantes), dois (4 variantes) ou três (4 variantes) isolados. Trinta e duas cepas não tiveram a VR1 identificada. As variantes mais representativas ( $n > 5$ ) foram VR1 5 com oito isolados (3,6%), variante 22 com 93 isolados (41,9%) sendo 90 NmC (97%) e apenas 3 NmB (3%), variante 19-6 com 6 isolados (2,7%), todos sorogrupo B, variante 5-11 com 11 isolados (5%), sendo 10 NmC (91%) e apenas uma NmB (9%) e variante 19-36 com 49 isolados (22%) onde 7 cepas são NmC (14%) e 42 NmB (86%).

Dentre os isolados do sorogrupo B, as variantes 19-6 e 19-36 foram as mais frequentes, representando respectivamente 6% e 48% dos isolados deste sorogrupo.

Já para os isolados do sorogrupo C, as variantes mais frequentes foram 5-8 (5%), 22 (67%), 5-11 (7,5%) e 19-36 (5,2%).

#### **4.3.1.2. Região Variável 2 de PorA (VR2)**

O componente OMV da vacina experimental 4CMenB contém a proteína PorA subtipo P1.7-2,4. A resposta imune induzida por este antígeno tem sido relacionada especificamente com o epítipo da VR2 (P1.4).

As variantes de VR2 foram bem diversificadas, com 22 variantes diferentes. Destes, dezessete variantes foram identificados em apenas um (9 variantes), dois (5 variantes), três (2 variantes) ou quatro isolados (uma variante). Quatorze cepas não tiveram a VR2 identificada. As variantes mais representativas ( $n > 5$ ), que totalizaram 80, 2% dos isolados, foram a V.2 com 8 isolados (3,6%) sendo 7 NmC (87,5%) e apenas uma NmB (12,5%), variante 10-62 com 10 isolados (4,5%) todas NmC, variante 14-6 com 87 isolados (39%) sendo 86 NmC (98,8%) e apenas uma NmB (1,2% - P2931), variante 1-10 com 25 isolados (11,2%) onde duas cepas são NmC (8%) e 23 (92%) NmB e variante 15-39 com 54 isolados (24,3%), 7 NmC (13%) e 47 NmB (87%).

Dentre os isolados do sorogrupo B, duas variantes somadas representam mais de 78% dos isolados deste sorogrupo, são elas variante 1-10 com 23 isolados (26,2%) e variante 15-39 com 47 isolados (53,4%). O sorogrupo C apresentou quatro variantes importantes são elas V.2 com 7 isolados (5%), variante 10-62 com 10 isolados (7,5%), 14-6 com 86 isolados (64%) e variante 15-39 com 7 isolados (5%).

A variante 4 (P1.4) presente na OMV que compõe a vacina multicomponente anti-meningocócica não foi identificada em nenhuma das cepas deste estudo, sendo esta uma observação importante tendo em vista a alta imunogenicidade da VR2 e sua relevância como componente desta vacina em desenvolvimento.

#### **4.3.1.3. Região Variável 3 de PorA (VR3)**

Neste estudo foram identificadas oito variantes. Destas, 5 variantes foram identificados em apenas um (1 variante) ou três isolados (4 variantes). Dez cepas não

tiveram a variante identificada. Apenas três variantes de VR3 foram identificadas em um pouco mais de 88% dos isolados, foram elas: variante 36 com 60 isolados (27%) sendo 9 NmC (15%) e 51 NmB (85%), variante 35-1 com 31 isolados (14%), 7 NmC (22,6%) e 24 NmB (77,4%) e variante 36-2 com 105 isolados (47,3%) sendo 102 NmC (97,2%) e apenas 3 NmB (2,8%).

As variantes 35-1 e 36, juntas correspondem a aproximadamente 85% dos isolados sorogrupo B. A variante 35-1 está presente em 24 isolados (27,3%) e a variante 36 em 51 isolados (57,9%) deste sorogrupo. Nas cepas sorogrupo C a variante 36-2 foi predominante representando 78,3% dos isolados deste sorogrupo. A variante 36 também foi encontrada em cepas NmC com 9 isolados (6,7%). Sete isolados sorogrupo C (5,2%) foram identificados como variante 35-1.

#### **4.3.1.4. Classificação por Subtipo (VR1 e VR2 de PorA)**

Neste estudo 30 subtipos (combinação da VR1 e VR2) do gene *porA* foram identificados. Destes, 24 subtipos foram identificados em apenas um (15 subtipos), dois (8 subtipos) ou quatro isolados (1 subtipo). Vinte e sete isolados não tiveram o subtipo identificado, sendo 17 isolados VR2 1-10 que não tiveram a VR1 identificada). Os cinco principais subtipos (cinco ou mais isolados), que correspondem a 71,5% de todos os isolados, foram P1.5,2 (n=8 / 3,6%), P1.22,14-6 (n=86 / 38,7%), P1.19-6,15-39 (n=5 / 2,25%), P1.5-11,10-62 (n=7 / 3,15%) e P1.19-36,15-39 (n=53 / 23,8%).

Por sorogrupo, os subtipos se mostraram bem regulares, como o subtipos P1.5-11,10-62 para NmC e o subtipo P1.19-6,15-39 para o sorogrupo B. Para o subtipo P1.22,14-6, 86 amostras (98,8%) foram NmC e apenas uma (1,2%) sorogrupo B (P2931). O mesmo foi observado P1.5,2 onde 7 isolados (87,5%) são NmC e uma (12,5%) NmB. O subtipo mais heterogêneo foi o P1.19-36,15-39 que apresentou 8 cepas NmC (15%) e 45 NmB (85%).

### 4.3.2. FetA

FetA é uma proteína de membrana externa que também demonstrou induzir a produção de anticorpos quando estes foram encontrados em soro de pacientes com doença meningocócica. Por esse motivo, foi considerado um potencial antígeno para compor uma vacina meningocócica (BLACK *et al.*, 1986; BEUCHER & SPARLING, 1995). A variabilidade desta proteína fez com que essa aplicação não fosse possível, mas esta característica faz com que FetA seja empregado como marcador molecular de *N. meningitidis* (THOMPSON *et al.*, 2003; JOLLEY *et al.*, 2007).

Vinte e quatro variantes de FetA (FetA VR) foram identificadas, porém vinte e uma variantes foram identificados em apenas um (13 variantes), dois (6 variantes), três (uma variante) ou cinco isolados (uma variante). Apenas em uma cepa não foi possível identificar a FetA VR. Três variantes representaram 92,3% dos isolados analisados. A variante F3-6 foi identificada em 9 isolados (4%), todas NmC. A variante F3-9 esteve presente em 104 isolados (46,8%) sendo 103 NmC (99%) e apenas um isolado NmB (1% - P2931). Setenta e cinco isolados (33,8%) foram caracterizados como F5-1, onde apenas nove isolados sorogrupo C (12%) e 66 sorogrupo B (88%).

As variantes F3-6 e F3-9 foram claramente associadas ao sorogrupo C, onde juntas correspondem a 83,6% desse sorogrupo. O mesmo ocorre com a variante F5-1 que está associada ao sorogrupo B, compreendendo 83% dos isolados deste sorogrupo.

### 4.3.3. Caracterização genotípica dos isolados

Seguindo a classificação proposta por Jolley e colaboradores (2007), os isolados deste estudo foram agrupados por sorogrupo, subtipo (PorA VR1 e VR2), Região variável de FetA (FetA VR) e complexo clonal. Esses dados estratificados fornecem a classificação genotípica dos isolados.

Dentre os genótipos encontrados seis foram os mais representativos ( $n > 3$ ). São eles: C:P1.5,2:F3-9 cc 11 com 7 isolados (3,15%), B:P1.19-36,15-39; F5-1 cc32 com 37 isolados (14,9%), C:P1.19-36,15-39; F5-1 cc32 com 5 isolados (2,25%),

C:P1.22,14-6:F3-9 cc103 com 84 isolados (37,8%) e C:P1.5-11;10-62:F3-9 cc103 com 6 isolados (2,7%), como demonstrado na tabela abaixo.

**Tabela 7.** Distribuição dos genótipos mais frequentes de Nm por ano e região.

Genótipo	Região	2003	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
C:P1.5,2:F3-9 cc11	BA					1	6			7
	BA			5	1	24	4			34
C:P1.22,14-6: F3-9 cc103	PE					8	20	11	4	43
	RJ					2	1	4		7
B:P1.19-36,15-39; F5-1 cc32	AM		1							1
	PE	2	4	9	4	5	1	2	1	28
	RJ	1				1	2			4
	SC	4								4
C:P1.19-36,15-39; F5-1 cc32	BA					3	1			4
	RJ					1				1
C:P1.5-11;10-62: F3-9 c103	BA						6			6

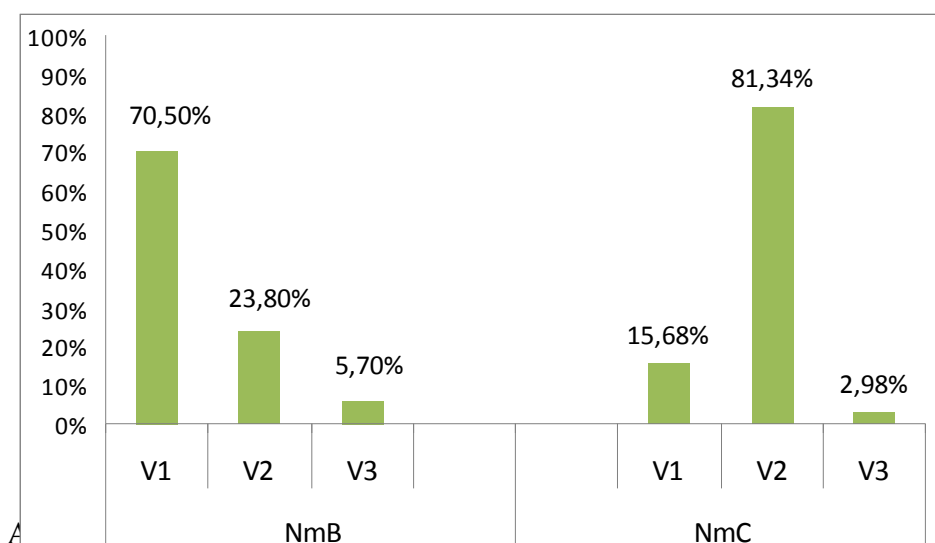
Conforme demonstrado na tabela acima, os genótipos C:P1.5,2:F3-9 cc11 e C:P1.5-11;10-62:F3-9 cc103 foram exclusivos à Bahia. Gorla e colaboradores (2011) relatam o aumento da incidência do meningococo sorogrupo C no estado da Bahia no sw76 ano de 2009. Como se pode observar na tabela, todos os principais genótipos encontrados neste estudo foram circulantes no estado da Bahia no período de 2008 e 2009, com exceção do genótipo relacionado ao sorogrupo B, já que não foram identificadas cepas NmB naquele estado dentre as cepas pesquisadas. O único genótipo representativo do sorogrupo B foi o B:P1.19-36,15-39; F5-1 cc32. Uma observação importante deste genótipo é que o mesmo esteve circulante, de uma maneira geral, em todos os anos e estados (exceto BA) compreendidos nesse estudo, em especial no estado de Pernambuco. Todas as 4 cepas do estado de Santa Catarina, foram do mesmo ano e genótipo o que podemos supor ter se tratado de um surto

naquela região. O genótipo C:P1.19-36,15-39; F5-1 cc32, que embora as OMPs sejam características de NmB, apresentou 4 cepas do sorogrupo C isoladas no estado da Bahia e uma no Rio de Janeiro. O genótipo C:P1.22,14-6: F3-9 cc103 foi o mais encontrado ao longo dos isolados e também foi bem distribuído, sendo identificado nos três estados com maior representatividade neste estudo (PE, BA e RJ), o que demonstra ser um genótipo constante no Brasil. Assim como ocorreu com o genótipo do sorogrupo B, o genótipo P1.5,2:F3-9 cc11, que é característico do sorogrupo C, apresentou uma única cepa NmB (B:P1.5,2:F3-9 cc11) isolada no estado de Pernambuco, no ano de 2006 (cepa P2931).

#### 4.4. Prevalência e diversidade de fHbp

O gene *fHbp* foi detectado em todas as cepas deste estudo. De acordo com o sequenciamento do gene *fHbp* destas cepas, e alinhamento com sequências de referência das três variantes do gene, foi possível determinar a prevalência das variantes de acordo com o sorogrupo. Dentre os isolados de Nm do sorogrupo B, 62 (70,5%) foram caracterizadas como Variante 1, 21 (23,8%) como Variante 2 e 5 (5,7%) como Variante 3. Nos isolados Nm sorogrupo C, 21 (15,68%) foram identificadas como Variante 1, 111 (81,34%) como Variante 2 e 4 (2,98%) como Variante 3 (figura10).

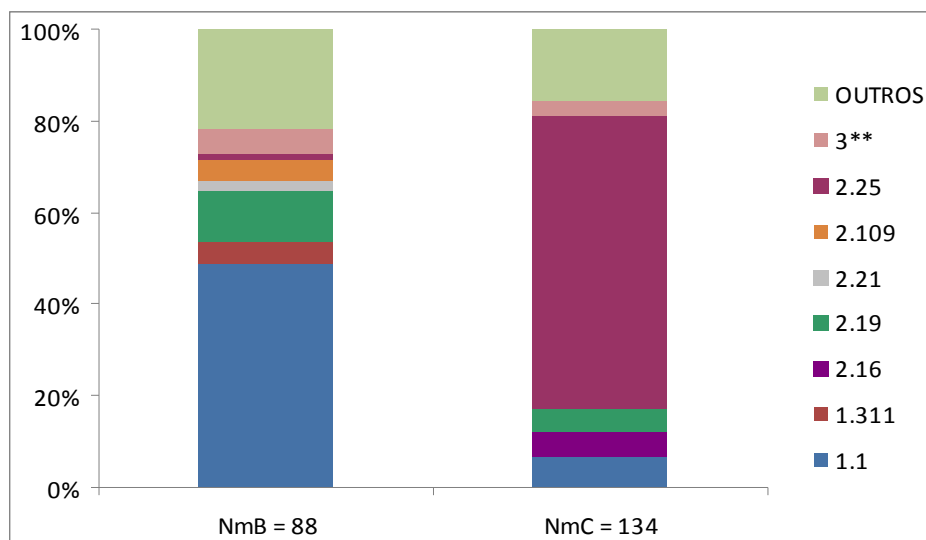
**Figura 10.** Distribuição dos isolados sorogrupos B e C por variante da fHbp. Classificação da proteína em variantes 1, 2 e 3 (Novartis) estratificada por sorogrupo.



s subvariantes da fHbp são nomeadas de acordo com suas sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos, de acordo com o banco de dados (<http://neisseria.org>), na qual subvariantes alélicas são designadas por um identificador numérico. Essa identificação é feita associando o número identificador do alelo da proteína, juntamente com a designação correspondente de variante atribuída pela Novartis (variante 1, 2 ou 3); por exemplo, fHbp 1.15 refere-se a variante 1, subvariante 15 (alelo 15) (LUCIDARME *et al.*, 2010).

Identificamos 49 alelos diferentes da proteína fHbp nas cepas analisadas neste estudo. As sequências das três variantes apresentaram grande variabilidade, porém alguns alelos foram bem representados como a subvariante 1.1, que foi identificada em 52 cepas (23,4%), sendo 43 NmB (82,7%) e nove NmC (17,3%). A subvariante 2.19 foi identificada em sete isolados (3,15%), todos NmC. Dezesete cepas (7,6%) foram classificadas como subvariante 2.19, sendo 10 NmB (58,8%) e sete NmC (41,2%). Oitenta e sete amostras (39,2%) foram identificadas como subvariante 2.25, sendo 86 (98,8%) NmC e apenas um isolado (1,2%) NmB foi identificado para esta subvariante (cepa P2931). As subvariantes 1.311 e 2.109 foram identificadas em quatro cepas cada (1,8%), sendo todas pertencentes ao sorogrupo B. As demais subvariantes que apresentaram menos de quatro isolados associados (n=40/18,02%, sendo 19 NmB e 21 NmC) foram agrupadas e representadas como “outros” e estão demonstradas na figura abaixo (figura 11).

**Figura 11.** Distribuição das subvariantes de fHbp por sorogrupos. Demonstração das subvariantes mais representativas (> 4 isolados), \*\* com exceção das subvariantes associadas à variante 3, onde foram identificados 9 alelos diferentes.



É possível fazer uma associação entre as subvariantes e os sorogrupos. Nas cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B, a variante 1.1 foi identificada em 48,9% dos isolados deste sorogrupo. As subvariantes 1.311 e 2.109 se mostraram exclusivas às cepas sorogrupo B deste estudo, representando cada uma 4,5% do total desses isolados. A subvariante 2.25 foi nitidamente associada ao sorogrupo C, uma vez que aproximadamente 99% dos isolados com essa variação da proteína são NmC. Esta subvariante esteve presente em 64,2% das cepas *N.meningitidis* sorogrupo C deste estudo. A subvariante 2.19 foi a mais heterogênea, não permitindo associação a nenhum dos sorogrupos.

A vacina multicomponente 4CmenB em ensaios clínicos possui a subvariante 1.1 de fHbp em sua composição. Dentre os isolados deste estudo, esta subvariante esteve presente em apenas 23,4% dos isolados. Vale destacar que esta vacina está sendo desenvolvida especificamente para o sorogrupo B, onde aqui foi identificada em 48,9% das cepas de NmB. A presença desta subvariante em apenas 6,7% dos isolados de NmC, mostra que esta imunidade conferida por esta proteína não poderia ser aplicada para cepas do sorogrupo C. A vacina bivalente rFHbp contém as variantes 1 e 2 de fHbp, que representa, quando combinadas, 94,3% das cepas de *N. meningitidis* B e em 97% das cepas sorogrupo C. A combinação destas duas



variantes poderia oferecer uma cobertura teórica de 96,8% de todas as cepas deste estudo.

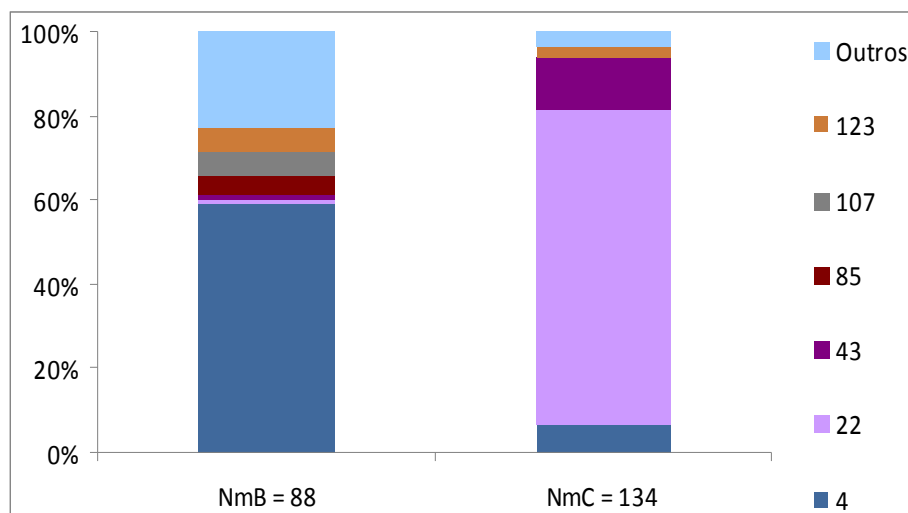
#### 4.5. Prevalência e diversidade de NHBA

Todas as cepas analisadas apresentaram o gene *nhbA*. Assim como o gene de *fHbp*, as subvariantes de NHBA foram obtidas através da tradução das sequências de nucleotídeos submetidas ao banco de dados (<http://neisseria.org>), na qual variantes alélicas também são designadas por um identificador numérico atribuído a um alelo.

Foram identificadas 22 subvariantes diferentes de NHBA. A subvariante 4 foi identificada em 52 (23,42%) das 222 cepas deste estudo, sendo 43 NmB (82,7%) e nove NmC (17,3%). Cento e uma amostras (45,5%) foram caracterizadas como subvariante 22, sendo 100 NmC (99%) e apenas uma NmB (1%) (cepa P2931). Como subvariante 43 foram identificadas 18 cepas (8,11%), sendo uma NmB (5,6%) e 17 NmC (94,4%). As subvariantes 85 e 107 foram identificadas em quatro (1,80%) e cinco (2,25%) das cepas analisadas, respectivamente, ambas correspondem ao sorogrupo B. A subvariante 123 foi caracterizada em oito isolados (3,60%), onde cinco NmB (62,5%) e três NmC (37,5%). As demais subvariantes que apresentaram menos de quatro isolados associados (n=25/11,26%, sendo 20 NmB e 5 NmC) foram agrupadas e representadas como “outros” como demonstrados na figura abaixo (figura 12).

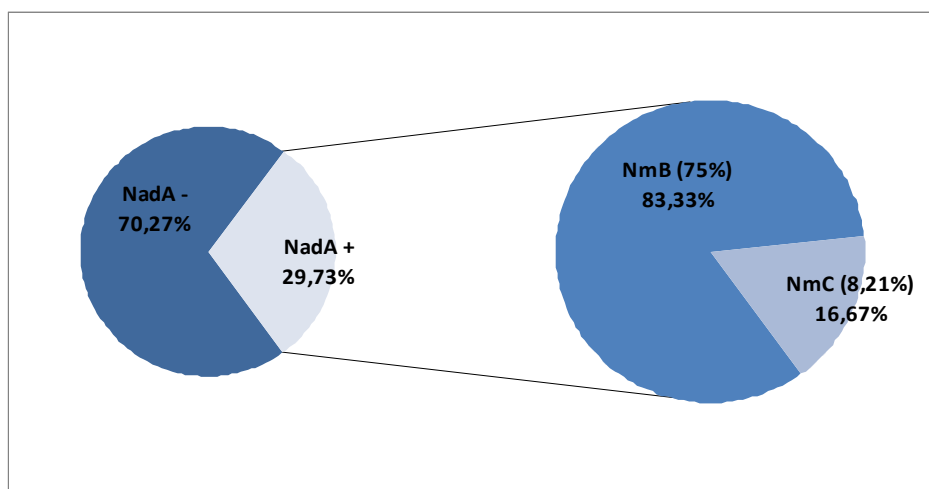
As cepas do sorogrupo B foram bem representadas pela subvariante 4, uma vez que 82,7% dos isolados desta subvariante são destes sorogrupo. Esta subvariante foi identificada em 48,9% dos isolados de NmB. As subvariantes 85 e 107 foram identificadas apenas em isolados do sorogrupo B o que representou 4,5% e 5,7% deste sorogrupo. A subvariante 22 foi claramente associada às cepas sorogrupo C, onde foi identificada em 74,5% desses isolados. A subvariante 43 também foi mais presente em cepas de NmC e foi encontrada em 12,7% dos isolados deste sorogrupo.

A subvariante 2, que está presente na vacina multicomponente 4CMenB, não foi identificada em nenhum dos isolados deste estudo.

**Figura 12.** Distribuição das variantes de NHBA por sorogrupos.

#### 4.6. Prevalência de NadA

Dentre as 222 amostras analisadas, apenas 66 (29,73%) apresentaram o gene *nadA*. Destas, 55 (83,33%) pertencem ao sorogrupo B, o que corresponde a 75% das cepas NmB deste estudo. Apenas onze isolados (16,67%) do sorogrupo C foram positivos, correspondendo a 8,21% das cepas NmC analisadas (figura 13).

**Figura 13.** Prevalência de NadA. Representação das amostras positivas distribuídas por sorogrupo.

#### 4.7. Análise filogenética de fHbp e NHBA

A estrutura filogenética dos dois antígenos vacinais revelada pelo SplitsTree, confirmou a forte associação das variantes antigênicas com os sorogrupos conforme mostra as figuras 14 e 15.

Para a fHbp, os isolados que agruparam com a sequência de referência da Variante 2, mostram um grande grupo homogêneo contendo somente cepas do sorogrupo C com exceção da cepa NmB P2931, todas do CC103. Um pouco mais distante, mas ainda no mesmo ramo desse grupo, estão alocados outros isolados dos dois sorogrupos e de complexo clonais diferentes sendo 16,6% CC8, 44,4% CC32, 22,2% CC11, 5,5% CC41 e 11,1% de outros complexos clonais. Deve-se observar a estreita associação do complexo clonal CC103 do sorogrupo C à Variante 2 na fHbp. A Variante 1 formou um grupo mais distante dos isolados das outras duas variantes, contendo cepas dos dois sorogrupos e de complexo clonais variados sendo o CC32 mais predominante com 84,2% dos isolados seguido pelo CC11 (4,3%), CC103 (3%) e outros complexo clonais (8,5%). É importante notar que duas cepas pertencentes ao CC103 não agruparam com a Variante 2 como a grande maioria das cepas desse complexo clonal.

A análise da NHBA pelo SplitsTree, mostrou a mesma divisão apresentada pela fHbp com três grupos principais sendo o grupo maior formado pela grande maioria das cepas do sorogrupo C, CC103 pertencentes à subvariante 22 da NHBA. Da mesma forma que ocorreu com a fHbp, os outros dois grupos foram formados pela subvariante 4 contendo 84% das cepas do sorogrupo B do CC32 e um terceiro grupo mais distante contendo 68% de cepas do sorogrupo C, CC11 subvariante 43 e 24% de cepas dos dois sorogrupos, subvariante 123, de complexos clonais variados. Mais uma vez é clara a associação de determinadas subvariantes ao sorogrupo e a certos complexos clonais.

**Figura 14.** Análise filogenética de fHbp. Agrupamento com sequências de referência das variantes 1, 2 e 3 (V.1, V.2 e V.3).

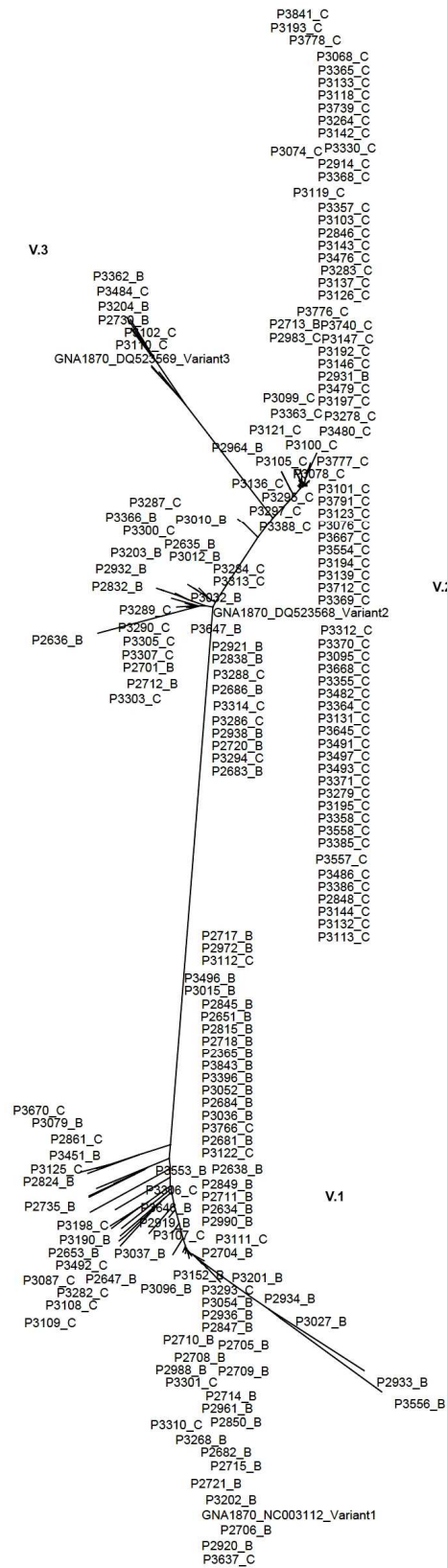
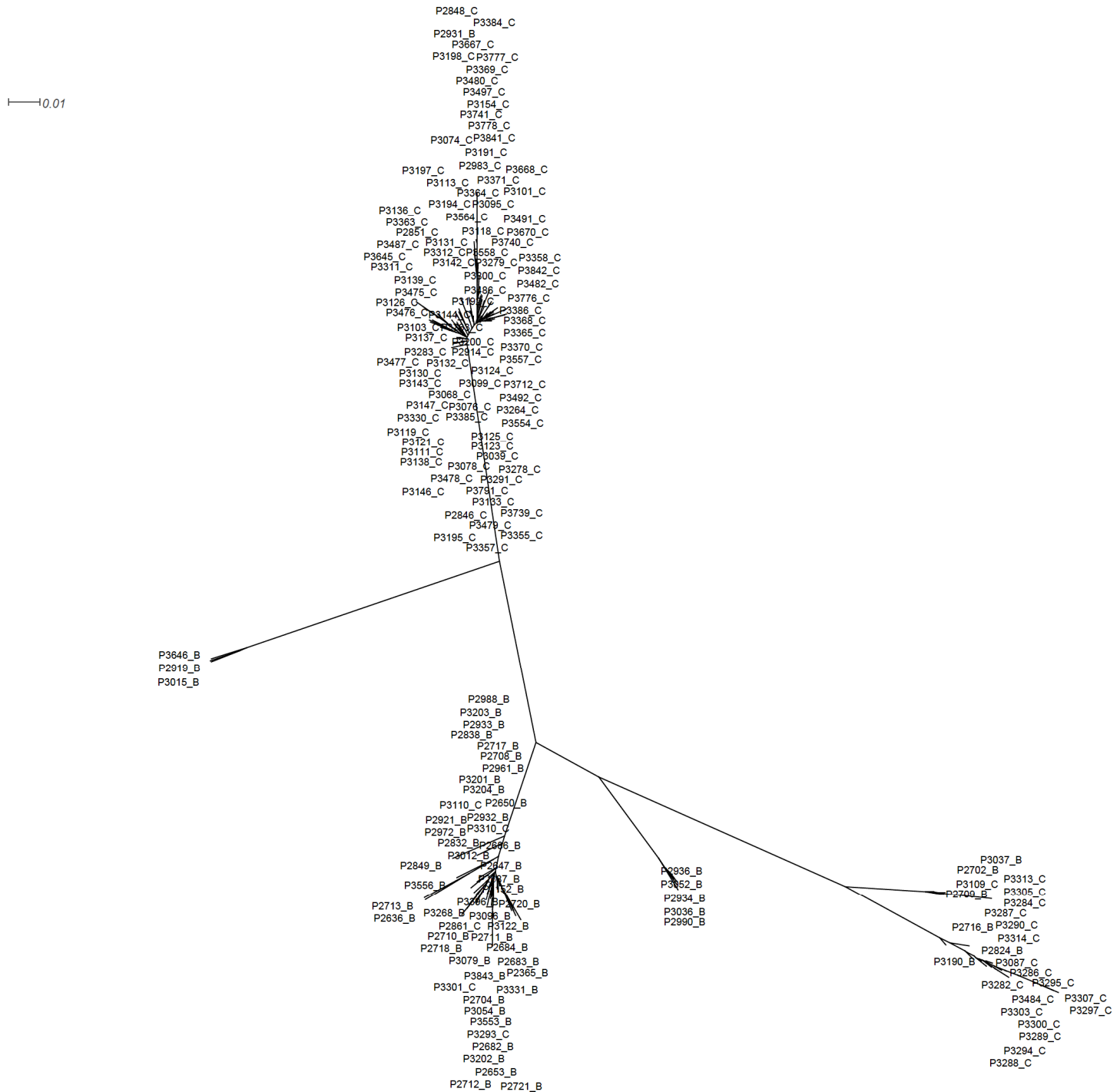


Figura 15. Análise filogenética de NHBA.



#### 4.8. Detecção de possível “troca de cápsula” (*Capsule Switching*)

Neste estudo foram identificados seis isolados que apresentaram características de possível mudança de cápsula. A cepa P2931 sorogrupo B, apresentou o mesmo genótipo de outras 83 cepas sorogrupo C, o P1.22,14-6:F3-9 cc103, o que leva a hipótese da mudança do polissacarídeo de B para C. Já as cepas do so sorogrupo C P2955, P3107, P3110, P3122 e P3310, apresentaram o genótipo C:P1.19-36,15-39;F5-1 cc32, característico dos isolados de NmB, que neste estudo foi encontrado em 37 cepas desse sorogrupo.

**Tabela 8.** Características genóticas de isolados com possível *capsule switching*.

<b>Cepa</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Genótipo</b>	<b>PorA VR3</b>	<b>NHBA</b>
P2931	B	B:P1.22,14-6:F3-9 (cc ST-103)	36-2	22
P2955	C	C:P1.19-36,15-39; F5-1 (cc32)	36	4
P3107	C	C:P1.19-36,15-39; F5-1 (cc32)	36	4
P3110	C	C:P1.19-36,15-39; F5-1 (cc32)	36	4
P3122	C	C:P1.19-36,15-39; F5-1 (cc32)	36	4
P3310	C	C:P1.19-36,15-39; F5-1 (cc32)	36	4

## 5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços científicos no campo das imunizações, a doença meningocócica permanece como um sério problema de saúde pública, estando relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças e lactentes. Além disso, a DM requer uma intervenção terapêutica específica e precoce, e enfatiza a necessidade de disponibilizar vacinas que possam ser utilizadas rotineiramente na prevenção dessa doença. Neste contexto, as vacinas polissacarídicas conjugadas contra os sorogrupos A, C, W135 e Y, oferecem proteção adequada e duradoura a crianças menores de 2 anos de idade, desencadeando, ainda, excelente resposta de memória. Essas vacinas demonstraram efetividade, reduzindo o número de casos de DM, já que também diminui a colonização da bactéria e assim a sua transmissão.

A fraca imunogenicidade do polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* sorogrupo B e seu potencial de induzir a produção de anticorpos auto-ímmunes dificultou o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra esse sorogrupo. Esta dificuldade levou à busca de antígenos alternativos para o desenho de uma vacina universal. O sequenciamento do genoma de *N. meningitidis* e o surgimento da abordagem da vacinologia reversa, proporcionaram a identificação de novos antígenos promissores (RAPPUOLI, 2000). A partir desta técnica aumentaram as perspectivas no desenvolvimento de uma vacina única contra a doença meningocócica sorogrupo B, abrangendo todas as cepas circulantes, diminuindo o custo da produção e promovendo a imunização eficaz de crianças de todas as idades em todo o mundo.

Embora os estudos envolvendo novos antígenos tenham surgido para sanar o problema relacionado ao polissacarídeo B, as vacinas com antígenos protéicos levantaram discussões sobre a produção de uma vacina universal, capaz de conferir imunidade contra todos os sorogrupos de *N. meningitidis* (BEERNINK *et al.*, 2009b; HARRIS *et al.*, 2011). Ensaios pré-clínicos da vacina bivalente rFHbp, já foram realizados com isolados de NmC, mostrando boa resposta bactericida, sugerindo que esta vacina poderia conferir proteção contra os sorogrupos B e C (HARRIS *et al.*, 2011). Por este motivo, incluímos neste estudo isolados clínicos do sorogrupo C, que

desde 2005 tem sido o sorogrupo responsável pela maioria dos casos de DM no Brasil.

Em junho de 2011 a indústria farmacêutica Novartis, apresentou oficialmente os primeiros resultados clínicos da utilização de uma nova vacina concebida através da vacinologia reversa. A vacina chamada 4CmenB (Multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine) é formada por 4 componentes ou antígenos vacinais, as proteínas fHbp, NHBA e NadA e uma vesícula de membrana externa extraída da cepa vacinal Neo-Zelandesa NZ98/254 sorosubtipo P1.7-2,4 (NOVARTIS, 2011). Estudos recentes mostram que a vacina é capaz de conferir proteção contra cepas pertencentes aos três genótipos incluídos na vacina, mas há evidências da necessidade de doses adicionais para proteger contra variantes de meningococos B circulantes em outras regiões geográficas, o que deverá ser estabelecido por futuras investigações. Estudos adicionais deverão ser conduzidos para se determinar a eficácia da vacina em diferentes faixas etárias incluindo recém-nascidos.

O presente estudo fornece estimativas da prevalência e diversidade genética de antígenos de superfície de *N. meningitidis* circulantes no Brasil, contidos nas duas vacinas candidatas, entre isolados do sorogrupo B e C. Os genes que codificam a síntese dos três principais antígenos incluídos na nova vacina, foram analisados quanto à sua prevalência e diversidade genética entre isolados dos sorogrupos B e C em 5 estados brasileiros representando as 4 macrorregiões do país. A presença de um ou mais genes que codificam os antígenos em todos os isolados dos dois sorogrupos, sugere que estas vacinas podem proporcionar uma proteção contra a doença meningocócica no Brasil. Para demonstrar o potencial de cobertura destes antígenos nas vacinas, no entanto é preciso conhecer a distribuição e a diversidade desses genes.

Os resultados da caracterização dos isolados pelo MLST revelaram 6 complexos clonais. Os CCs ST-41/44 e ST-1136 se mostraram exclusivos ao sorogrupo B e o CC ST-32/ET-15, que habitualmente é associado ao sorogrupo B apresentou 12,5% de NmC (DE FILLIPIS *et al.* 2012). Os CCs, ST-8/A4, ST-11/ET-37 e ST-103 foram bem relacionados com o sorogrupo C, tendo esses dois últimos uma cepa NmB cada. De uma maneira geral, foi possível associar os complexos clonais aos sorogrupos, mas a presença de sorogrupos diferentes no mesmo CC



evidencia os frequentes eventos de recombinação comuns entre os meningococos (BEDDEK *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011).

Dos três antígenos estudados para compor a vacina universal contra o meningococo, a proteína fHbp é o mais importante, pois está presente nas duas vacinas em desenvolvimento, na vacina rfHbp bivalente, que contém duas variantes deste antígeno (V1 e V2), e também está presente na vacina multicomponente, que possui apenas uma variante (V1) na composição. O antígeno fHbp foi encontrado em todos os isolados deste estudo. Dentre os isolados do sorogrupo B, 70,5% foram classificados como variante 1 e 23,8% como variante 2, que somadas representam 94,3% dos isolados deste sorogrupo. Em relação ao sorogrupo C observou-se o inverso, onde a variante 2 foi mais presente, em 81,34% dos isolados, e a variante 1 com 15,68%, que somadas correspondem a 97,02% dos isolados desse sorogrupo. Além da classificação por variantes, existe também a classificação em subvariantes, que é feita pela variante acrescida do número do alelo determinado pelo banco de dados. Neste estudo foram encontrados 49 subvariantes diferentes de fHbp, onde algumas podem ser claramente associadas ao sorogrupo, como a subvariante 1.1, bem representada pelo sorogrupo B, uma vez que 82,7% dos isolados eram deste sorogrupo. Já a subvariante 2.25 se mostrou ainda mais homogênea onde 98,8% das cepas foram NmC e apenas uma sorogrupo B, a cepa P2931. A classificação por subvariantes é útil para análise da distribuição e variabilidade genética da proteína, porém a questão da imunogenicidade fica restrita a classificação por variantes, uma vez que a reação cruzada intravariantes, independente de suas subvariações, se mostrou eficiente (LUCIDARME *et al.*, 2010).

Com relação a reação cruzada intervariantes, sabe-se que é extremamente fraca, o que permite afirmar que uma variante de fHbp não confere imunidade a outra (PIZZA, *et al.*, 2000; LUCIDARME *et al.*, 2010). Por isso a preocupação na identificação destas variantes e a idéia de se combinar duas dessas variantes em uma vacina para que se possa alcançar uma cobertura vacinal ideal (PIZZA *et al.*, 2008; WELSCH & RAM, 2008;). No caso da vacina da Pfizer, que é uma vacina bivalente combinando as variantes 1 e 2 de fHbp, de acordo com os nossos resultados seria possível alcançar a cobertura vacinal acima de 90% em ambos os sorogrupos. Já no caso da vacina multivalente 4CmenB da Novartis, que possui apenas a subvariante 1.1 em sua composição, essa cobertura, dentro do universo desta pesquisa, seria de

70,5% para o sorogrupo B e apenas 15,7% para o sorogrupo C, o que estaria bem abaixo do que se considera ideal para cobertura vacinal.

Com o surgimento das vacinas com antígenos proteicos, a questão da mutação e variabilidade destas proteínas como forma de escape pode ser um risco para o sucesso desses imunizantes. No caso de vacina multicomponente 4CMenB, a combinação de diferentes antígenos, além de potencializar a cobertura vacinal também é uma forma de diminuir os riscos de um escape por mutação ou recombinação genética. A inclusão das proteínas NHBA, NadA e OMV junto com a fHbp em uma única vacina faz parte dessa estratégia.

Neste estudo, todas as cepas apresentaram o gene de NHBA. Foram identificadas 22 subvariantes desta proteína, onde apenas cinco delas se apresentaram de forma representativa com mais quatro isolados apresentando a mesma variante. Assim como fHbp, é possível associar algumas destas subvariantes com os dois sorogrupos. Um exemplo é a subvariante 4, que foi encontrada em 82,4% dos isolados do sorogrupo B. A subvariante 22 esteve presente em 101 amostras, destas, 100 (99%) do sorogrupo C e apenas uma do sorogrupo B (1% - cepa P2931). NHBA tem sido implicada na opsonização fagocítica e tem demonstrado reatividade cruzada com subvariantes heterólogas (WELSH *et al.*, 2003; LUCIDARME *et al.*, 2010). O que significa que apesar da subvariante presente na vacina 4CMenB ser a v.2, e a mesma não ter sido encontrada dentre as amostras analisadas, seria possível obter uma cobertura de até 100% dos isolados deste estudo com este componente vacinal, porém vale lembrar que o real impacto de NHBA nesta vacina ainda não está bem estabelecido (WANG *et al.*, 2011, GOSSGER *et al.*, 2012; SANTOLAYA *et al.*, 2012).

A presença global de NadA em *N. meningitidis* tem sido em aproximadamente 50% (COMANDUCCI *et al.*, 2002) sendo frequentemente associada às cepas que pertencem a determinados complexos clonais hipervirulentos como o CC32, CC11 e CC8 (COMANDUCCI *et al.*, 2012). Neste estudo, apenas 29,73% dos isolados apresentaram o gene *nadA* pela PCR. Desses, 83,33% são do sorogrupo B (correspondendo a 75% de NmB positivas para NadA) e 16,67% do sorogrupo C. Essa alta incidência de *nadA* encontrada entre as cepas do sorogrupo B e baixa entre as do sorogrupo C, pode ser explicada pelo grande número de NmB pertencentes ao CC ST-32/ET-5 e baixo número de isolados de Nmc dos CC 11 e

CC8 aos quais a presença da NadA tem sido associada. (COMANDUCCI *et al.*, 2002; COMANDUCCI *et al.*, 2004).

Uma outra estratégia da vacina multicomponente é adicionar uma OMV extraída da cepa epidêmica de Nova Zelândia NZ98/254 (P1.7-2.4). As vacinas baseadas nas vesículas de membrana externa, são conhecidas por ter como principal antígeno a proteína PorA que apesar de se mostrar bem imunogênica, sua alta variabilidade faz com que essa proteção seja conferida apenas durante epidemias causadas por uma mesma variante, apresentando um baixo impacto contra cepas contendo alta variabilidade o que é comum em muitas regiões (MARTIN *et al.*, 2006; WEDEGE, 2007;). Na vacina 4CMenB, a OMV contém o subtipo P1.7-2,4, ou seja PorA VR1: 7-2 e VR2: 4. Já foi demonstrado que a resposta imune induzida por este antígeno tem sido relacionada especificamente ao epítipo da VR2 (MARTIN *et al.*, 2006). Dentre as cepas analisadas, não foi encontrado nenhum isolado que apresentasse o mesmo subtipo de porA que compõe a vacina, e nem mesmo as variantes isoladas. Encontramos 30 subtipos diferentes, porém seis subtipos foram os mais frequentes, que juntos equivalem a 82% de todos os isolados. O subtipo P1.19-6,15-39 foi associado unicamente ao sorogrupo B, enquanto os subtipos P1.5,2; P1.5-11,10-62 e P1.22,14-6 ao sorogrupo C, sendo este último encontrado em apenas uma cepa NmB (P2931). O subtipo P1.19-36,15-39, foi um pouco mais heterogêneo, porém tendendo ao sorogrupo B que correspondeu a 84,9% desse subtipo. Estes resultados demonstraram a variabilidade da PorA e a necessidade de adequar a OMV da vacina aos subtipos circulantes no Brasil, já que a permanência dessa OMV numa possível vacina a ser utilizada em nosso país, seria completamente inútil. Vale ressaltar que a prevalência de determinados subtipos está claramente associada ao sorogrupo, o que nos leva a concluir que seria necessária a combinação de mais de um subtipo, ou mais de um tipo de OMV, para haver a cobertura dos dois sorogrupos.

A VR3 é uma outra região variável de PorA, que vem sendo investigada como um possível novo antígeno (CLARK, *et al.*, 2003; DE FILIPPIS *et al.*, 2007). A baixa variabilidade genética desta VR e sua capacidade de estimular anticorpos bactericidas, fez com que a variabilidade desse antígeno fosse investigada neste estudo. Neste estudo, apenas três variantes da VR3 foram identificadas de forma significativa (n>5). As variantes 35-1 e 36 se associadas, poderiam cobrir 85% das

cepas do sorogrupo B. A variante 36-2 sozinha cobriria 76% dos isolados sorogrupo C. Uma associação entre as variantes 36 e 36-2 ofereceria uma cobertura de aproximadamente 74% dos isolados e a associação das três variantes 35-1, 36 e 36-2 cobriria 89% de todos os isolados do estudo. Estes resultados demonstram a baixa variabilidade da VR3 em relação às demais regiões variáveis de PorA e a importância do monitoramento deste antígeno nas pesquisas para desenvolvimento de novas vacinas anti-meningocócicas.

Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que está havendo um aumento da variabilidade genética das proteínas de membrana externa entre os meningococos estudados, principalmente no sorogrupo C, que tem sido associado a vários surtos no Brasil desde que a incidência desse sorogrupo começou a aumentar em 2005 (GORLA, 2012). Esse aumento da variabilidade genética pode diminuir a eficácia das futuras imunizações com vacinas multicomponentes como a que está sendo desenvolvida pela Novartis.

As vacinas polissacarídicas NmC estão sendo aplicadas onde os surtos são detectados, o que pode estar influenciando esta variabilidade e conseqüentemente sua eficácia. Apesar de não conter proteínas da membrana externa, as vacinas NmC conjugadas poderiam estar selecionando genótipos específicos que não seriam cobertos pela vacina multicomponente. No Brasil, desde julho de 2010 a vacina adsorvida meningocócica C (conjugada - CRM197) foi introduzida no calendário de vacinação da criança (Ministério da Saúde, 2010), o que pode vir a estimular a pressão seletiva do sorogrupo B ou a recombinação genética do polissacarídeo a longo prazo. O mecanismo de troca de cápsula (*capsule switching*) entre os meningococos não está bem esclarecido, porém já foi descrito por alguns autores como um mecanismo de escape do meningococo (SWARTLEY, *et al.*, 1997; ALCALÁ *et al.*, 2002). Apesar de termos detectado uma clara troca de cápsula em apenas seis cepas, existem fortes indícios de que outras cepas do sorogrupo C poderiam ter trocado a composição polissacarídeo capsular transformando-se em B, tendo em vista essa variação de OMPs anteriormente associadas ao sorogrupo C. Esse seria mais um mecanismo de escape da proteção conferida pela vacina conjugada C ocasionado pela pressão seletiva da vacina e pela facilidade de recombinação que os meningococos apresentam.

Esses resultados demonstram a necessidade de monitorar a tendência do possível aumento desse fenômeno de recombinação para que não se utilize uma vacina que não seja eficaz contra as cepas circulantes. Esses dados reforçam a importância da implementação de uma vacina realmente eficaz contra o sorogrupo B, para cobrir além das cepas NmB circulantes, os escapes das cepas NmC como descrito acima.

A diversidade genética encontrada entre os antígenos expostos na membrana externa, também precisa ser monitorada para que as autoridades sanitárias possam ter os dados necessários para a adoção da nova vacina multicomponente que já se encontra em ensaios clínicos em fase avançada em outros países (GOSSGER *et al.*, 2012; SANTOLAYA *et al.*, 2012). A vacina 4CMenB em seu último ensaio clínico demonstrou ser imunogênica em crianças e lactentes, principal população de interesse, mas não alcançou os níveis de imunogenicidade de uma vacina polissacarídica (GOSSGER *et al.*, 2012). Um outro dado relevante é que a mesma se mostrou eficaz contra as cepas de referência, evidenciando a importância da análise da variabilidade genética das proteínas de cepas circulantes em cada país.

## 6. CONCLUSÕES

A proteína fHbp é o principal antígeno das vacinas antimeningocócicas sorogrupo B em desenvolvimento. Embora essas vacinas estejam sendo desenvolvidas para o sorogrupo B, este estudo mostrou que a combinação de duas variantes de fHbp (variante 1 e 2), como na vacina bivalente da Pfizer, ofereceria uma cobertura de 96,8% de todas as cepas desse trabalho, inclusive as do sorogrupo C. A mesma cobertura não seria conferida pela vacina multicomponente 4CMenB, pois nesta composição está presente somente a variante 1 de fHbp, que foi identificada em 70,5% de isolados do sorogrupo B e em apenas 15,68% dos isolados do sorogrupo C.

A proteína NHBA foi bem caracterizada e regular e está presente em todas as cepas analisadas. Apesar da subvariante 2 que compõe a vacina não ter sido identificada em nenhum dos isolados deste estudo, a reação imunogênica cruzada entre as subvariantes poderiam conferir uma cobertura de até 100%, porém diferentemente de fHbp o real impacto de NHBA nesta vacina ainda não está bem estabelecido.

A OMV incluída nesta vacina contém o subtipo P1.7-2,4, o qual não foi identificado em nenhum dos isolados deste estudo, fazendo com que esta vesícula de proteínas não tenha utilidade na composição de uma vacina multicomponente a ser utilizada no Brasil.

A baixa variabilidade da VR3 de PorA, encontrada nos isolados deste estudo, faz com que este peptídeo seja considerado um possível alvo de novas vacinas meningocócicas.

Embora este estudo tenha demonstrado o potencial do antígeno fHbp como um único componente da vacina meningocócica, é importante reforçar a necessidade de uma vacina multicomponente, visando cobrir os possíveis mecanismos de escape de *N.meningitidis* como a mudança de cápsula polissacarídicas e mutações nos genes que codificam a síntese das proteínas da membrana externa.

De uma maneira geral, foi possível associar as variantes das proteínas que compõe as vacinas aos sorogrupos e complexos clonais. Isso é importante, uma vez que ajuda a monitorar possíveis mutações de *N. meningitidis*, auxiliando no

desenvolvimento de estratégias de prevenção com essas vacinas e monitorando possíveis mecanismos de escape do meningococo.

## REFERÊNCIAS

ALCALÁ, B ;ARREAZA, L; SALCEDO, C; URÍA, MJ; DE LA FUENTE, L; VÁZQUEZ, JA. Capsule Switching among C:2b:P1.2,5 meningococcal Epidemic Strains after Mass Immunization Campaign, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v.. 8, p. 1512-1514, 2002.

ARDITI, M & YOGEV, R. Common etiologic agents of bacterial *N. meningitidis*. In: **The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases**. Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR. 5. Ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 316-322, 1997.

BAETHGEN, LF. Epidemiologia da doença meningocócica no Rio Grande do Sul, caracterização molecular e da resistência à penicilina em isolados de *Neisseria meningitidis*. Tese (doutorado): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica. 123 p., 2007.

BAI, X & BORROW, R. Genetic shifts of surface-exposed proteins of *Neisseria meningitidis* serogroup B. **Expert Rev. Vaccines**; v. 9(10), p.1203–1217, 2010.

BAMBINI, S; MUZZI, A; OLCEN,P; RAPPUOLI, R; PIZZA,M; COMANDUCCI, M. Distribution and genetic variability of three vaccine components in a panel of strains representative of the diversity of serogroup B meningococcus. **Vaccine** ;v. 27, p. 2794–2803, 2009.

BARROSO, DE. Doença Meningocócica In: **Medicina Tropical – Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. BATISTA RS, GOMES AP, IGREJA RP, HUGGINS DW. Ed. Cultura Médica, p.521-549, 2000.

BARROSO, DE; CARVALHO, DM; CASAGRANDE, ST; REBELO, MC; SOARES, V; ZAHNER, V; SOLARI, CA; NOGUEIRA, SA. Microbiological epidemiological history of meningococcal disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**; v.14(3), p.242-251, 2010.

BEERNINK, PT; LEIPUS, A; GRANOFF, DM Rapid genetic grouping of factor H-binding protein (genome-derived neisserial antigen 1870), a promising group B meningococcal vaccine candidate. **Clin Vaccine Immunol**; v.13. p.758–763, 2006.

BEERNINK, PT; LOPASSO, C; ANGIOLILLO, A; FELICI, F; GRANOFF, D. A region of the N-terminal domain of meningococcal factor H-binding protein that elicits bactericidal antibody across antigenic variant groups. **Molecular Immunology**; v.46, p.1647-1653, 2009 a.

BEERNINK, PT; CAUGANT, DA; WELSCH, JA; KOEBERLING, O; GRANOFF, DM. Meningococcal Factor H-Binding Protein Variants Expressed by Epidemic



Capsular Group A, W-135 and X Strains from Africa. **The Journal of Infectious Diseases**; v.199, p1360-1368, 2009 b.

BEDDEK, AJ; LI, MS; KROLL, JS; JORDAN, TW; MARTIN, DR. Evidence for Capsule Switching between Carried and Disease-Causing *Neisseria meningitidis* Strains. **Infect Immun**, p. 2989–2994, 2009.

BENNETT, DE & CAFFERKEY, MT. Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. **J Med Microbiol**, v.52(Pt 9), p. 781-787, 2003.

BERNARDINI, G, BRACONI, D., MARTELLI, P. SANTUCCI, A. Postgenomics of *Neisseria meningitidis* for vaccines development. **Expert Rev Proteomics** v.(4),p. 667–677, 2007.

BEUCHER, M & SPARLING, PF. Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Bacteriol**, v.177, p.2041–2049, 1995.

BLACK, JR; DYER, DW; THOMPSON, MK; SPARLING, PF. Human immune response to iron-repressible outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun**, v.54, p.710–713, 1986.

BLOCK, C; VÁZQUEZ, JA. Antibiotic resistance. In: Frosch M, Maiden M. *Handbook of Meningococcal disease*. Weinheim: Wiley-VGH Verlag,: 53–74, 2006.

BORROW, R; GOLDBLATT, D; ANDREWS, N; SOUTHERN, J; ASHTON, L; DEANE, S. Antibody persistence and immunological memory at age 4 years after meningococcal group C conjugate vaccination in children in the United Kingdom. **J Infect Dis**.;v.186, p.1353-7, 2002

BRANCO, RG; AMORETTI, CF; TASKER, FC. Doença meningocócica e meningite. **J Pediatr**. v.83 (2 Suppl):p.46-53, 2007.

BRASIL. Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os produtos. Diário Oficial da União, Brasília, 7/1/1977, seção 1, p.11, 1977.

BRASIL. Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes. Diário Oficial da União, Brasília, 20/09/1990.

BRASIL. Resolução RDC n. 73, de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. Diário Oficial da União, Brasília, 02/12/2008.

BREHONY, C; JOLLEY, KA; MAIDEN, MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. **FEMS Microbiol Rev**, p.01-12, 2006.

BRICKS, L. F. Doenças meningocócicas - morbidade e epidemiologia nos últimos 20 anos: revisão. **Pediatria**; v. 24(3/4), p. 122-31, 2002.

BRUGE, J; BOUVERET, M; DENVE, B. Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult male volunteers. **Vaccine**, v.22(9-10), p.1087-1096, 2004.

BULLEN, C. Taking public health to the streets: the 1998 Auckland meningococcal disease awareness program. **Health Educ Behav**. v.27, p.363-70, 2000.

CAPECCHI, B ;ADU-BOBIE,J ; DI MARCELLO,F; CIUCCHI, L; MASIGNANI, V; TADDEI, A; RAPPUOLI, R; PIZZA, ARICÒ, B. Neisseria meningitidis NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. **Mol Microbiology**; v.55 (3), p.687–698, 2005.

CAROFF, M. & KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydr. Res**, v. 338, p. 2431-2447, 2003.

CARVALHANAS, TRMP. *Meningites Bacterianas*. **Rev. Prática Hospitalar**. São Paulo, ano VII, n. 38, mar/abr 2005.

CAUGANT, DA. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **APMIS**, v.106(5), p.505-525, 1998.

CLARKE, SC; DIGGLE, MA; MOLLING, P; UNEMO, M; OLCEN, P. Analysis of PorA variable region 3 in meningococci: implications for vaccine policy? **Vaccine**, v.21, p.2468–2473, 2003.

COMANDUCCI, M ; BAMBINI, S ; BRUNELLI, B ;ADU-BOBIE, J ; ARICÒ,B; CAPECCHI, B; GIULIANI,MM; MASIGNANI, V; SANTINI, L ; SAVINO, S; GRANOFF, DM; CAUGANT, DA; PIZZA, M; RAPPUOLI, R; MORA, M. NadA, a Novel Vaccine Candidate of *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med**; v.195, p. 1445–1454, 2002.

COMANDUCCI, M ; BAMBINI, S ; BRUNELLI, B ; CAPECCHI, B; GIULIANI, MM; MASIGNANI, V; SANTINI, L ;CIUCHI, L; CAUGANT, DA; PIZZA, M; RAPPUOLI, R; MORA,M. NadA Diversity and Carriage in *Neisseria meningitidis*. **Infect and Immun**; p. 4217–4223, 2004.

DANZIG, L. Meningococcal vaccines. **Pediatr Infect Dis J**. v.23(12 Suppl), p.S285-92, 2004.

DAYMAM, S. Searching for a vaccine. Meningitis UK, 2009. Disponível em: <http://www.meningitisuk.org/aboutmeningitis/bacteriameningitis/meningococcal.htm>. Acesso em 12 mar.2012.

DE FILIPPIS, I & VICENTE, AC. Multilocus sequence typing and repetitive element-based polymerase chain reaction analysis of *Neisseria meningitidis* isolates in Brazil reveal the emergence of 11 new sequence types genetically related to the ST-32 and ST-41/44 complexes and high prevalence of strains related to hypervirulent lineages. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.53(3),p. 161-167, 2005.

DE FILIPPIS, I. *Neisseria meningitidis* no Brasil: implantação de novo método para diagnóstico molecular e caracterização genética por “Multilocus Sequence Typing – MLST” e Rep-PCR. Tese - Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.

DE FILIPPIS, I; DE ANDRADE, CF; SILVA, L; PREVOTS, DR; VICENTE, AC. PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. **Infect Immun**. v.75, p.3683–3685, 2007.

DE FILIPPIS, I. Quest for a broad-range vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B: implications of genetic variations of the surface-exposed proteins. **J Med Microbiol**; v. 58, p. 1127-1132, 2009.

DE FILIPPIS, I ; GOPALAN, V; HUYEN, Y. PorA VR3 Typing Database: A web-based resource for the determination of PorA VR3 alleles of *Neisseria meningitidis*. **Infection, Genetics and Evolution** , v.11 p.,248–249, 2011.

DE FILIPPIS ,I; LEMOS, APS; HOSTETLER, JB; WOLLENBERG, K;SACCHI, CT; HARRISON, LH; BASH, MC; PREVOTS, R. Molecular Epidemiology of *Neisseria meningitidis* Serogroup B in Brazil. **PLoS ONE** , v.7(3), p. 1-10, 2012.

DE VOE, I.W. The Meningococcus and Mechanisms of Pathogenicity. **Microbiol. Rev.** 1982, 42(2):162-190.

DIGGLE, MA & CLARKE, SC. Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach. **J Med Microbiol** v.52, p.51–57, 2003.

DIGGLE, MA; CLARKE, SC. Molecular methods for the detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. **Expert Rev Mol Diagn**. v.6, p.79–87, 2006.

DONALISIO, MR; Rocha, MMM; RAMALHEIRA, RMF; KEMP, B. Meningococcal disease diagnostic criteria in Greater Metropolitan Campinas, São Paulo State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**; v. 20(6),p.1531-1537, 2004.

DYET, KH; SIMMONDS, RS; MARTIN, DR. Multilocus restriction typing method to predict the sequence type of meningococci. **J Clin Microbiol**, v. 42(4),p.1742-1745, 2004.

ENRIGHT, MC & SPRATT, BG. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol**, v.7(12): p.482-487, 1999.

FAZIO, C; STARNINO, S; SOFIA, T; NERI, A; MASTRANTONIO, P; STEFANELLI, P. *Neisseria meningitidis* serogroup X sequence type 2888, Italy. **Emerg Infect Dis**, v. 16, 2010.

FEAVERS, IM; GRAY, SJ; URWIN, R; RUSSELL, JE; BYGRAVES, JA; KACZMARSKI, EB; MAIDEN, MC. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. **J Clin Microbiol**, v.37(12), p.3883-3887, 1999.

FINDLOW, F; BORROW, R; SNAPE, MD; DAWSON, T; HOLLAND, A; JOHN, TM; EVANS, A; TELFORD, KL; YPMA, E; TONEATTO, D; OSTER, P; MILLER, E; POLLARD, AJ. Multicenter, Open-Label, Randomized Phase II Controlled Trial of an Investigational Recombinant Meningococcal Serogroup B Vaccine With and Without Outer Membrane Vesicles, Administered in Infancy. **Clin Infect Dis**; v.51(10), p.1127–1137, 2010.

FINNE, J ; BITTER-SUERMAN, D; GORIDIS, C; FINNE, U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extra-neural tissues. **J Immunol**; v.138, p.4402-4407, 1987.

FRASCH, CE; ZAHRADNIK, IM; WANG, L. Antibody response in adults to an aluminum hydroxide adsorbed *Neisseria Meningitidis* serotype 2b protein group B-polysaccharide vaccine. **J. Infect.**, v.29, p.23-31, 1994.

GAMA, SG; MARZOCHI, KB; DA SIVEIRA FILHO, GB. Epidemiological characterization of meningococcal disease in a metropolitan area in Southeastern Brazil,1976-1994. **Rev Saude Publica**. v.31(3), p.254-262, 1997.

GIULIANI, M.M.; ADU-BOBIE, J.; COMANDUCCI, M.; SAVINO, S. SANTINI, L. et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proc Natl Acad Sci USA**; v.103(29), p. 10834-10839, 2006.

GORLA, MCO; PAIVA ,MV; SALGUEIRO, VC, LEMOS, APS; BRANDÃO, AP; VÁZQUEZ, JA; BRANDILEONE, MCC. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated from meningitis cases in Brazil from 2006 to 2008. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**;v.29(2), p. 85–89, 2011.

GORLA, MCO; LEMOS, APS; QUARESM, M; VILASBOAS, R; MARQUES, O; SÁ, UM; OGASSAVARA, CT BRANDILEONE, MCC; HARRISON, LH; DIAS, J. Phenotypic and molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* associated with an outbreak in Bahia, Brazil. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v.30, p.77-84, 2012.

GOSSGER, N; SNAPE, MD; YU, LM; FINN, A; BONA, G; ESPOSITO, S; PRINCIPI, N; DIEZ-DOMINGO, J ; SOKAL, E ; BECKER, B; KIENINGER, D; PRYMULA, R; DULL, P; YPMA, E; TONEATTO, D; KIMURA, A; POLLARD, AJ. Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules:A randomized controlled trial. **JAMA**, v. 307, p. 573-582 , 2012.

GRECO, M. The future of vaccines: An industrial perspective. **Vaccine**; v. 20, p. 101-103, 2002.

HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.41:95-98.

HARRIS, SL; ZHU, D; MURPHY, E; MCNEIL, LK; WANG, X; MAYER, LW; HARRISON, LH; JANSEN, KU; ANDERSON, AS. Preclinical evidence for the potential of a bivalent fHBP vaccine to prevent *Neisseria meningitidis* serogroup C disease. **Human Vaccines**; v.7,p.68-74, 2011.

HART, CA & ROGERS, TRF. Meningococcal disease. **J Med Microbiol**, v.39, p. 3-25, 1993.

HUSON, DH & BRYANT, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. **Molecular Biology and Evolution**, v.23(2), p.254-267, 2006.

JACOBSSON, S; THULIN, S; MOLLING, P; UNEMOA, M; COMANDUCCI, M ; RAPPUOLI, P ; OLCÉN, P. Sequence constancies and variations in genes encoding three new meningococcal vaccine candidate antigens. **Vaccine**; v. 24, p. 2161–2168, 2006.

JANDA, WM & KNAPP, JS. Gram-negative bacteria: *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. **Manual of Clinical Microbiology**. ASM Press, Washington, D.C. 8<sup>th</sup> edition, vol. I. p. 585-608, 2003.

JESSOURON, E; SILVEIRA, IFB; LARNJEIRA, AP; PEREIRA, S; et al. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipopolysaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent meningitidis serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. **Vaccine**; v.22, p.2617-2625, 2004.

JIANG, HQ; HOISETH,SK; HARRIS,LS; MCNEIL,LK; ZHU,D; TAN, C; SCOTT, AA; ALEXANDER,K; MASON,K; MILLER,L; DASILVA,I; MACK,M; ZHAO,XJ; PRIDE, MW; ANDREW,L; MURPHY, E; HAGEN,M; FRENCH,R; ARORA,A; JONES,TR; JANSEN,KU; ZLOTNICK,GW; ANDERSON,AS. Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease. **Vaccine**; v.28 p.6086–6093, 2010

JOLLEY, KA; BREHONY, C; MAIDEN, MC. Molecular typing of meningococci: recommendations for target choice and nomenclature. **FEMS Microbiol Rev**, v.31(1), p. 89-96, 2007.

KOEBERLING, O; WELSCH, J A; GRANOFF, DM. Improved immunogenicity of a H44/76 group B outer membrane vesicle vaccine with over-expressed genome-derived Neisserial antigen 1870. **Vaccine**; Feb 26, v.25(10), p. 1912-20, 2007.

LEMOS AP. Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C, grande São Paulo, 1990 a 2003. Tese (doutorado): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. 119 p., 2005.

LUCIDARME, J; COMANDUCCI, M; FINDLOW,J; GRAY, SJ; KACZMARSKI,EB; GUIVER,M; VALLELY, PA; OSTER, P; PIZZA, M; BAMBINIS; MUZZI, A; BORROW, R. Characterization of *fHbp*, *nhba* (*gna2132*), *nadA*, *porA*, and Sequence Type in Group B Meningococcal Case Isolates Collected in England and Wales during January 2008 and Potential Coverage of an Investigational Group B Meningococcal Vaccine. **Clin and Vaccine Immun**; p. 919–929, 2010.

MAIDEN, MC. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. **FEMS Microbiol Lett**, v.112(3): p.243-250, 1993.

MAIDEN, MC. Population genomics: diversity and virulence in the *Neisseria*. **Curr Opin Microbiol**. v.11(5), p.467-71, 2008.

MARTIN, D; RUIJNE, N; MCCALLUM, L; O'HALLAHAN, J ; OSTER, P. The VR2 Epitope on the PorA P1.7-2,4 Protein Is the Major Target for the Immune response Elicited by the Strain-Specific Group B Meningococcal Vaccine MeNZB. **Clinical And Vaccine Immunology**, p. 486–491, 2006.

MARTIN, SL; BORROW, R ; VAN DER LEY,P; DAWSON, M; FOX, AJ; CARTWRIGHT, KAV. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. **Vaccine**,v.18, p.2476-2481, 2000.

MASSARI, P; RAM, S; MACLEOD, H; WETZLER, LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. **Trends in Microbiol**, v.11(2): p.87-93, 2003.

MILAGRES, L. G.; MELLES, C. E. A. Imunidade conferida por vacinas anti-meningocócicas. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 27, n. 3, p. 221-226, 1993.

Ministério da Saúde, Brasil. **Introdução da vacina meningocócica c (conjugada) no calendário de vacinação da criança**. Coordenação-Geral Do Programa Nacional De Imunizações; Brasília, julho/2010. Disponível em : [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/it\\_meningo\\_implantacao.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/it_meningo_implantacao.pdf). Acesso em junho de 2012.

MOLLING, P; UNEMO, M; BACKMAN, A; OLCEN, P. Genosubtyping by sequencing group A, B and C meningococci; a tool for epidemiological studies of epidemics, clusters and sporadic cases. **APMIS** v.108, p.509–516, 2000.

*MURPHY, E; ANDREW, L; LEE, KL; DILTS, DA; NUNEZ, L; FINK, PS; AMBROSE, K; BORROW, R; FINDLOW, J. et al. Sequence Diversity of the Factor H Binding Protein Vaccine Candidate in Epidemiologically Relevant Strains of Serogroup B Neisseria meningitidis. **The Journal of Infectious Diseases**; v.200, p.379–389, 2009.*

MURPHY, KM; O'DONNELL, KA; HIGGINS, AB; O'NEILL, C; CAFFERKEY, MT. Irish strains of *Neisseria meningitidis*: characterisation using multilocus sequence typing. **Br J Biomed Sci**, v.60(4), p. 204-209, 2003.

NASSIF, X. Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucariotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? **Current Opinion in Microbiology**, 2: 71-77, 1999.

NASSIF, X; PUJOL, C; MORAND, P; EUGÈNE, E. Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle? **Mol Microbiol**, v.32(6), p.1124-1132, 1999.

NASSIF X. A furtive pathogen revealed. **Science**,v. 287: p.1767-1768, 2000.

Novartis International AG. **Novartis Media Release, 2011**. Disponível em:[http://www.novartisvaccines.com/newsroom/mediareleases/2010/04112010\\_men b.pdf](http://www.novartisvaccines.com/newsroom/mediareleases/2010/04112010_men b.pdf). Acesso em março de 2012.

OOMEN, CJ; HOOGERHOUT, P; BONVIN, AM; KUIPERS, B; BRUGGHE, H, TIMMERMANS, H; HASELEY, SR; VAN ALPHEN, L; GROS, P. Immunogenicity of peptide-vaccine candidates predicted by molecular dynamics simulations. **J Mol Biol**. v.328, p. 1083–1089, 2003.

PETTERSSON, A; MAAS, A; VAN WASSENAAR, D; VAN DER LEY, P; TOMMASSEN, J. Molecular characterization of FrpB, the 70-kilodalton iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun.** v. 63, p. 4181–4184, 1995.

PIZZA, M; SCARLATO, V; MASIGNANI, V; GIULIANI, MM; ARICO, B; COMANDUCCI, M; JENNINGS, TG; et al. Identification of vaccine candidate against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**; v. 287(5459), p. 1816-1820, 2000.

PIZZA, M; DONNELLY, J; RAPPUOLI, R. Factor H-binding protein, a unique meningococcal vaccine antigen. **Vaccine**; v. 26S, p. 146-148, 2008.

POLLARD, AJ; PROBE, G; TROMBLEY, C; CASTELL, A; WHITEHEAD, S; BIGHAM JM; CHAMPAGNE, S; ISAAC-RENTON, J; TAN, R; GUIVER, M; BORROW, R; SPEERT, DP; THOMAS, E. Evaluation of a diagnostic polymerase chain reaction assay for *Neisseria meningitidis* in North America and field experience during an outbreak. **Arch Pathol Lab Med**, v.126(10): p.1209-1215, 2002.

POLLARD, JA. Meningococcal Disease and Vaccine Efficacy. **The Ped Infect Dis J** v.23, 12, Dec, 2004.

PONTE, CF. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciências e saúde**; v.10(2), p. 619-653, 2003.

PRINCIPI, N & ESPÓSITO, S. Universal protein vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B, *Streptococcus pneumoniae* and influenza. **Human Vaccines**, v.9, p. 905-912, 2011.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr Opin Microbiol**; v. 3, p. 445–450, 2000.

RIEDO, FS; PLIKAYTIS, BD; BROOME, CV. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. **Pediatr Infect Dis J**; v.14, p.643-657, 1995.

RIORDAN, FA. Improving promptness of antibiotic treatment in meningococcal disease. **Emerg Med J**; v.18, p.162–163. 2001.

ROSENSTEIN, NE; PERKINS, BA; STEPHENS, DS; POPOVIC, T; HUGHES, JM. Meningococcal disease. **N Engl J Med**, v.344(18), p. 1378-1388, 2001.

SACCHI, CT; LEMOS, AP; BRANDT, ME; WHITNEY, AM; MELLES, CE; SOLARI, CA; FRASCH, CE; MAYER, LW. Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable-region typing nomenclature. **Clin Diagn Lab Immuno**, v.5(6),p.845-855, 1998a.



SACCHI CT, LEMOS AP, WHITNEY AM, SOLARI CA, BRANDT ME, MELLES CE, FRASCH CE, MAYER LW. Correlation between serological and sequencing analyses of the PorB outer membrane protein in the *Neisseria meningitidis* serotyping system. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.5(3), p.348-354, 1998b.

SÁFADI, MA.; BARROS, AP. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **J Pediatr**; v. 82(3), p.35-44, 2006.

SANTOLAYA, ME; O'RYAN, ML; VALENZUELA, MT; PRADO, V; VERGARA, R; MUÑOZ, A; TONEATTO, D; GRAÑA, G; WANG, H; CLEMENS, R; DULL, PM.V72P10 Meningococcal B Adolescent Vaccine Study group. Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **Lancet**. V.18;379(9816), p.617-624, 2012.

SCARSELLI, M; CANTINI, F; SANTINI, L; VEGGI, D; DRAGONETTI, S; DONATI, C; SAVINO, S; GIULIANI, MM; COMANDUCCI, M; DI MARCELLO, F.; ROMAGNOLI, G; PIZZA, M; BANCI, L; RAPPUOLI, R. Epitope Mapping of a Bactericidal Monoclonal Antibody against the Factor H Binding Protein of *Neisseria meningitidis*. **J. Mol. Biol.** 2008.

SCHWARTZ, B; MOORE, PS; BROOME, CV. Global Epidemiology of meningococcal disease. **Clin Microbiol Rev**. Apr, p. S118-S124, 1989.

SELANDER, RK; CAUGANT, DA; OCHMAN, H; MUSSER, JM; GILMOUR, MN; WHITTAM, TS. Methods of Multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl Environ Microbiol.**, v.51, p. 837-884, 1986.

SERRUTO D, SPADAFINA T, CIUCCHI L, LEWIS LA, RAM S, TONTINI M. *Neisseria meningitidis* GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans. **PNAS**; v.107(8), p.3770–3775, 2010.

SETTE, A; RAPPUOLI R. Reverse Vaccinology: Developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**; v.33, p. 530-541, 2010.

SNAPE, MD; POLLARD, AJ. Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 21-30, 2005

STEFANELLI, P; FAZIO,C; SOFIA,T; NERI, A; MASTRANTONIO, P. Serogroup C meningococci in Italy in the era of conjugate menC Vaccination. **BMC Infect Dis**, v9:135, p.1-8, 2009.

STEPHENS, DS; GREENWOOD, B; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **Lancet**; v. 369, p. 2196–2210, 2007.

STRUELENS, MJ; DE GHELDRE, Y; DEPLANO, A. Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.19(8): p. 565-569, 1998.

SWARTLEY, JS; MARFIN, AA; EDUPUGANTU, S; LIU, LJ; CIESLAK, P; PERKINS, B. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc Natl Acad Sci USA**;94:271–276,1997.

SWARTLEY, JS; LIU, LJ; MILLER, YK; MARTIN, LE; EDUPUGANTI, S; STEPHENS, DS. Characterization of the Gene Cassette Required for Biosynthesis of the ( $\alpha$ 1-6)-Linked *N*-Acetyl-D-Mannosamine-1-Phosphate Capsule of Serogroup A *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol**; p. 1533–1539, 1998.

TAHA, MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. **J. Clin. Microbiol**, v.38(2), p. 855-857, 2000.

TAHA, MK. Molecular detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. **Expert Rev Mol Diagn**, v.2, p. 143-150, 2002.

TAN, LKK; CARLONE, GM; BORROW, R. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. **N Engl J Med**; v. 362,p.1511-1520, 2010.

TETTELIN, H; SAUNDERS, JN; HEIDELBERG, J; JEFFRIES, AC; NELSON, KE, et al. Complete Genome Sequence of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Strain MC58. , **Science**; v. 287, p.1809-1915, 2000.

THOMPSON, EAL; FEAVERS, IM; MAIDEN, MCJ. Antigenic diversity of meningococcal enterobactin receptor FetA, a vaccine component. **Microbiology**, v.149, p.1849–1858, 2003.

THOMPSON, MJ; NINIS, N; PERERA, R. Clinical recognition of meningococcal disease in children and adolescents. **Lancet**. v.367, p. 397–403, 2006.

TONEATTO, D; ISMAILI, S; YPMA, E; VIENKEN, K;OSTER, P; DULL, P. The first use of an investigational multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) in humans. **Human Vaccines**, v.7,p. 646-653,2011.

TSAI, CM ; FRASCH, CE; MOCCA, LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol**, v.146(1):p. 69-78, 1981.

TZENG Y-L. & STEPHENS DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microb Infec** v.2, p.687-700, 2000.

URWIN, R & MAIDEN, MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiol**.,v.11 No.10 Oct, 2003.

URWIN, R., RUSSELL, J.E., THOMSON, E.A. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococcal: implications for vaccine design. **Infect.Immun.**, 72(10), 5955-5962, 2004

VAN DAUREN, M; BRANDTZAEG, P; VAN DER MEER, J. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. **Clin. Microbiol Rev.**, v.13(1), p. 144-166, 2000.

VAN DER LEY, P; HECKELS, JE; VIRJIM; HOOGERHOUT, P; POOLMAN, JT. Topology of outer membrane porins in Pathogenic *Neisseria* spp. **Infection and Immunity**, sept, p. 2963-2971, 1991.

VOGEL, U & CLAUS, H. Molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **Front Biosci**, v.8: p.14-22, 2003.

VOLK, WA; GEHARDT, BM; HAMMARSKJÖLD, ML; KADNER, RJ. *Neisseriaceae*. In: **Essentials of Medical Microbiology**. 5<sup>th</sup> edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers,. p. 348-352, 1996.

WANG, X; COHN, A; COMANDUCCI, M; ANDREW, L; ZHAO, X; MACNEIL, JR; SCHMINK, S; MUZZI, A; BAMBINI, S; RAPPUOLI, R; PIZZA, M; MURPHY, E; HOISETH, SK; JANSEN, KU; ANDERSON, AS; HARRISON, LH; CLARK, TA; MESSONNIER, NE; MAYER, LW. Prevalence and genetic diversity of candidate vaccine antigens among invasive *Neisseria meningitidis* isolates in the United States. **Vaccine**, v.29, p.4739– 4744, 2011.

WEDEGE, E; HOIBY, EA; ROSENQVIST, E; FROHOLM, LO. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. **J Med Microbiol**, v.31(3): p.195-201, 1990.

WEDEGE, E; BOLSTAD, K; AASE, A; HERSTAD, TK; MCCALLUM, L; ROSENQVIST, E; OSTER, P; MARTIN, D. Functional and Specific Antibody Responses in Adult Volunteers in New Zealand Who Were Given One of Two Different Meningococcal Serogroup B Outer Membrane Vesicle Vaccines. **Clinical And Vaccine Immunology**, v.14, p. 830–838, 2007.

WELSCH, JA; MOE, GR; ROSSI, R; ADU-BOBIE, J; RAPPUOLI, R; GRANOFF DM. Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* candidate vaccine, confers protection against bacteremia in absence of complement-mediated bactericidal activity. **J Infect Dis**; v.188(11), p. 1730–1740, 2003.

WELSCH, JA.; RAM, S. Factor H and Neisserial pathogenesis. **Vaccine**. v.26S p.140–145, 2008.

WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization, 2006.

WILDER-SMITH, A. Meningococcal disease: Risk for international travellers and vaccine strategies. **Travel Medicine and Infectious Disease**; v. 6, p. 182–186, 2008.

ZEROUALI, K; ELMDAGHRI, N; BOUDOUMA, M; BENBACHIR, M. Serogroups, serotypes, serosubtypes and antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* isolates in Casablanca, Morocco. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; v.21, p. 483–485, 2002.

ZOLLINGER, WD; MANDRELL, RE; GRIFFISS, JM; ALTIERI, P; BERMAN, S. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. **J Clin Invest**, v.63(5), p. 836-848, 1979.

ZOLLINGER, WD; MORAN, EE; CONNELLY, H; MANDRELL, RE; BRANDT B. Monoclonal antibodies to serotype 2 and serotype 15 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and their use in serotyping. **Infect Immun**, v.46(1),p. 260-266, 1984.