

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A ANÁLISE DE
COMPONENTES VACINAIS CONTRA A MENINGITE MENINGOCÓCICA
SOROGRUPO B**

Por Claudia Maria da Conceição

Sob a orientação

Dr. José Godinho da Silva Júnior

e

Dr. André Luis Gemal

Rio de Janeiro

2012

Claudia Maria da Conceição

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A ANÁLISE DE
COMPONENTES VACINAIS CONTRA A MENINGITE MENINGOCÓCICA
SOROGRUPO B**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Doutorado em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr. Antonio Eugenio C. Cardoso Almeida - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr. Alexandre Porte – UNIRIO

Orientador: Prof. Dr. José Godinho da Silva Júnior

Co orientador: Prof. Dr. André Luis Gemal

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Conceição, Claudia Maria

Desenvolvimento de metodologias para a análise de componentes vacinais contra a meningite meningocócica sorogrupo B. / Claudia Maria da Conceição. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

131 f., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

1. *Neisseria meningitidis*. 2. OMV. 3. KDO. 4. Proteoma. 5. Vigilância Sanitária.

RESUMO

Nesse trabalho, foram desenvolvidas metodologias aplicadas ao controle de qualidade de vacinas antimeningocócicas sorogrupo B. Este desenvolvimento se deu com base na avaliação do perfil protéico das preparações vacinais. Para isso, foram desenvolvidas condições de análise para a identificação e caracterização dos antígenos vacinais por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Muitos antígenos importantes imunologicamente foram identificados e outros antígenos com menor importância também foram caracterizados por espectrometria de massas.

Para a avaliação imunológica das preparações vacinais foi produzido um anticorpo policlonal anti-OMV. Esse anticorpo foi capaz de identificar os antígenos majoritários imunologicamente presentes nas preparações.

Além do conteúdo do perfil proteico, foi feita a avaliação do conteúdo de LOS em preparações vacinais por metodologia físico-química. A cadeia o-específica do LOS é formada por um oligossacarídeo formado por unidades que se repetem de um açúcar de 8 carbonos denominado KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctulosônico). O KDO funciona como marcador químico da estrutura do LOS e a sua dosagem foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica com detecção amperométrica pulsada. Essa metodologia foi validada frente aos requisitos do INMETRO, e apresentou resultados satisfatórios para método de determinação quantitativa.

As metodologias desenvolvidas foram muito importantes para a garantia do direito à saúde, uma vez que é responsabilidade das autoridades sanitárias nacionais assegurarem que os imunobiológicos disponíveis no Brasil, de origem nacional ou não, sejam seguros, de qualidade e eficácia comprovadas, já que a garantia da qualidade dos imunobiológicos se deve, dentre outros motivos, ao fato de que tais produtos são aplicados em grupos de pessoas saudáveis e as campanhas expõem toda uma faixa etária da população ao insumo.

Palavras chave: *Neisseria meningitidis*, OMV, KDO, Proteoma, Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

In this work methodologies for meningococcal serogroup B vaccines were developed. The basic analyses were the protein profile by electrophoresis. For that, specific conditions for antigen characterization by two dimensional electrophoresis and mass spectrometry were developed. Many of the most important antigens were identified by mass spectrometry, as also some minor antigens.

For an immunological evaluation of vaccine preparations, polyclonal antibodies against outer membrane vesicles (OMVs). These antibodies recognize major antigens in the preparation.

The content of lipopoligosaccharide (LOS) in the preparations were also evaluated. O-specific chain of LOS has a 8 carbon sugar called 2-keto-3-deoxyoctulononic acid (KDO). KDO is a chemical marker of LOS structure; KDO was analyzed using high performance anion exchange chromatography of pulsed amperometric detection. This methodology was validated using INMETRO parameters; It is suitable for quantitative analysis.

All developed methodologies are important to health warranty, since vaccines efficacy, safety and quality are under the responsibility of health authorities in Brazil. Quality in vaccines is very important, since these products are used in a healthy age group of the population.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, OMV, KDO, Proteomic, Health surveillance.

A minha mãe Hybrahima Diniz Torga, *in memoriam*, que fez todo o possível para me dar uma boa educação e que sempre esteve ao meu lado me apoiando nas minhas conquistas e tornando possível boa parte delas. Que Deus a abençoe e que de onde você estiver possa compartilhar comigo mais essa vitória e ao meu filho que está chegando para iluminar ainda mais os meus dias.

AGRADECIMENTOS

Inúmeras pessoas, de várias formas diferentes, ajudaram na realização desse trabalho. Tentando não ser injusta a ninguém, os principais agradecimentos são:

A Diretoria do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS – Fiocruz, pela colaboração e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS-Fiocruz, representada pela Dra. Kátia Christina Leandro, pelo apoio e compreensão.

A chefia do Departamento de Química – INCQS-Fiocruz, representada pelo Dr. Filipe Soares Quirino da Silva, pelo apoio, incentivo, colaboração e trabalho em conjunto realizado durante todo o desenvolvimento da tese.

Ao grupo do laboratório de Produtos Biológicos – INCQS-Fiocruz, do qual eu faço parte, a todos que me ajudaram, o meu muito obrigado.

Aos bolsistas que me acompanharam durante o desenvolvimento deste trabalho, um obrigado especial a Anna Carolina Machado Marinho, Cinthia Souza, Diego Coutinho, Amanda Souto e Natália Meireles.

Aos meus orientadores, Dr. José Godinho da Silva Júnior e Dr. André Luis Gemal, que toparam essa roubada que foi me orientar.

Ao grupo do LAMAM- Bio-Manguinhos, representado pelo amigo Hilton Jorge do Nascimento, sempre disposto a me ajudar e participar deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microrganismos de Referência do Departamento de Microbiologia do INCQS-Fiocruz, representado pelo Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso.

Aos colegas do IOC/DFP-Fiocruz, Departamento de Espectrometria de massas, por possibilitarem a realização dos ensaios.

Aos colegas do biotério do INCQS-Fiocruz, pela ajuda com o trabalho com os animais e ao Dr. Alexandre Alves de S.Oliveira Dias pela viabilização deste experimento.

Ao Dr. Antonio Eugenio C. Cardoso Almeida, pelas muitas colaborações e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha família pelo apoio sempre.

A todos os meus amigos de caminhada diária.

E por fim, mas não por último aos dois grandes amores da minha vida, que são meu filho que está chegando e o seu pai Márcio André de Souza Gonçalves, que vem participando das minhas vitórias e derrotas, lutas e conquistas, neste desafio cotidiano que é viver. Obrigada por vocês existirem na minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS-14 - Alquilbenzenossulfonato

ACHC - Ácido Alfa-ciano-p-hidrocínâmico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

BCIP/NBT - 5-bromo-4-cloro-3-indolylfosfato-Nitro Blue Tetrazolium

BSA - Bovine Serum Albumin

BHE - Barreira Hemato-encefálica

CHAPS - 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano- sulfonato

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CoA - Co-enzima A

DM - Doença Meningocócica

DTT - Ditioneitol

EM - Espectrometria de massas

fHBP - Factor H Binding protein

ICH - International Conference on Harmonization

IEF - Focalização Isoelétrica

IgG - Imunoglobulina G

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

ISO - International Standardization Organization

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

KDO - Ácido 2-ceto-3-deoxioctulozônico

LAL - Lisado de amebócito de limulus

LOS - Lipooligossacarídeo

LPS - Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF - Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight

NadA - Neisserial adhesin A

NIPH - Norwegian National Institute for Public Health

NmB - *Neisseria meningitidis* sorogrupo B

Nm - *Neisseria meningitidis*

OMP - Outer membrane protein

Omp85 - Outer membrane protein

OMS - Organização Mundial de Saúde

OMV - Outer membrane vesicles

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pI - Ponto Isoelétrico

PM - Peso Molecular

PMF - Peptide mass fingerprint

PNI - Programa Nacional de Imunização

PorA - Porina A

PorB - Porina B

PVDF - Polivinildifluoreto

RPM - Rotações por Minuto

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SUS - Sistema Único de saúde

TBS - Tampão tris salino

TFA - Ácido trifluoracético

TTBS - Tampão tris salino acrescido de tween 20

UV - Ultra Violeta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01:	Distribuição global dos sorogrupos de <i>Neisseria Meningitidis</i>	21
Figura 02:	Representação esquemática do envelope celular de bactérias gram negativas	25
Figura 03:	Esquema da colonização meningocócica. A - Adesão e introdução de microvilosidades das células, B – Formação da microcolonização, C – Formação da placa cortical e fechamento da aderência, D – Invasão das células epiteliais humanas.	28
Figura 04:	Erupções cutâneas causadas pela doença meningocócica. A – Macular, B e C – Petequial	29
Figura 05:	Septicemia meningocócica fulminante. A – Septicemia meningocócica fulminante com equimoses, B – Olho com hemorragia intra-ocular durante a septicemia meningocócica fulminante, C – Trombose e gangrena causadas por septicemia meningocócica fulminante, D – Hemorragia das glândulas supra renais causadas por septicemia meningocócica fulminante.	30
Figura 06:	Monômero de ácido siálico presente na estrutura do polissacarídeo capsular de <i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo B	34
Figura 07:	Esquema de produção de OMV a partir de fermentação desenvolvida no Laboratório de Microrganismos de Referência – INCQS – Fiocruz.	51
Figura 08:	Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Foram aplicados 1µL de mistura de proteínas padrão e 10µL de amostra. A coloração foi feita pelo método da prata. (1) – Padrão, (2) – Preparação vacinal em condições nativas (3) Preparação vacinal em condições desnaturantes, (4) OMV em condições nativas, (5) – OMV em condições desnaturantes.	76
Figura 09:	Diagrama de Pareto relacionando o numero de spots e as condições experimentais para eletroforese bidimensional	81
Figura 10:	Superfície de resposta	82

Figura 11:	Superfície de resposta.	84
Figura 12:	Eletroforese bidimensional de preparações de OMV. Foi aplicado 125 µL de amostra, foi utilizado um strip de 7 cm, na primeira dimensão foi utilizado o Mini-Protean II Cell e na segunda dimensão foi utilizado o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%. Strip 3 – 10.	85
Figura 13:	Spots assinalados na região 1 gel identificados por EM.	87
Figura 14:	A - Sequencia da proteína identificada no spot 5 (código de acesso OMPB3_NEIMB). Os aminoácidos sublinhados correspondem ao peptídeo de sinalização. Em vermelho são mostrados os peptídeos identificados no PMF. Em fonte 12, itálico e negrito as alças variáveis. Em preto os peptídeos não identificados O peptídeo sombreado corresponde a identificação que não foi feita pelo Mascot. B – Estrutura tridimensional da OMPB3 MEIMB	88
Figura 15:	Spots assinalados na região 2 gel identificados por EM.	89
Figura 16:	Spots assinalados na região 3 gel identificados por EM.	90
Figura 17:	Imunoblot utilizado nos estudos de soro conversão.	94
Figura 18:	Comparação entre o gel obtido por eletroforese bidimensional(A) e o blot do gel de eletroforese bidimensional revelado com anticorpo anti-OMV (B).	96
Figura 19:	Estrutura do LPS – imunotipo IL3	97
Figura 20:	Esquema de análise de KDO, por cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada.	100

Figura 21: Cromatograma obtido no estudo de seletividade. Cromatograma (A), corresponde a adição de 200 μ L de padrão sigma a 200 μ L de solução padrão correspondente a concentração do menor ponto da curva de calibração (ponto 1). Cromatograma (B) Corresponde a adição de 200 μ L de padrão sigma a 200 μ L de solução padrão correspondente ao ponto 3 da curva de calibração. Cromatograma (C) Corresponde a adição de 200 μ L de padrão sigma a 200 μ L de solução padrão correspondente ao ponto 4 da curva de calibração. 109

Figura 22: Cromatogramas limite de quantificação e limite de detecção. Cromatograma (A) corresponde a concentração de 0,25 μ g/mL. Cromatograma (B) corresponde a concentração de 0,1 μ g/mL. Cromatograma (C) corresponde a concentração de 0,06 μ g/mL. 114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Resumo das características dos agentes bacterianos causadores de meningite.	23
Tabela 2:	Resumo de ensaios recomendados pela Farmacopéia Européia para vacinas contra meningites bacterianas.	40
Tabela 3:	Resumo de similaridades e diferenças entre as recomendações do INMETRO e ANVISA para a validação de metodologias analíticas	43
Tabela 4:	Resumo de fatores e níveis empregados no planejamento	54
Tabela 5:	Esquema de imunização dos camundongos com OMV	59
Tabela 6:	Esquema de diluição do soro para revelação da membrana	60
Tabela 7:	Resumo do procedimento de preparo da curva de calibração	65
Tabela 8:	Resumo do procedimento de preparo da curva de calibração	66
Tabela 9:	Resumo do procedimento de preparo das injeções para a avaliação de seletividade	67
Tabela 10:	Resumo do procedimento de preparo das amostras para a avaliação da exatidão	68
Tabela 11	Tabela de valores de Cochran.	71
Tabela 12	Resumo do teor de proteína encontrado para as fermentações desenvolvidas.	75
Tabela 13	Comparação dos pesos moleculares das bandas obtidas a partir do SDS-PAGE da preparação vacinal piloto em condições nativas (VN) e desnaturantes (VD) e da OMV obtida no INCQS em condições nativas (OMP N) e desnaturantes (OMP D).	77

Tabela 14	Antígenos chave na produção de anticorpos anti-OMV.	91
Tabela 15	Resumo de proteínas identificadas por eletroforese bidimensional em preparações de OMV.	92
Tabela 16	: Resultados obtidos para a curva de calibração – dia 1	103
Tabela 17	Resultados obtidos para a curva de calibração – dia 2	103
Tabela 18	Resultados obtidos para a curva de calibração – dia 3	104
Tabela 19	Pesquisa de valores aberrantes e avaliação da homocedasticidade – dia 1	105
Tabela 20	Pesquisa de valores aberrantes e avaliação da homocedasticidade – dia 2	106
Tabela 21	Pesquisa de valores aberrantes e avaliação da homocedasticidade – dia 3	107
Tabela 22	Resumo dos parâmetros avaliados no estudo de linearidade	108
Tabela 23	Resumo dos resultados obtidos nos estudos de repetitividade	110
Tabela 24	Resumo dos resultados obtidos nos estudos de precisão intermediária:	111
Tabela 25	Resumo dos resultados obtidos nos estudos de exatidão	112

SUMÁRIO

1 – Introdução	20
1.1 – Histórico	20
1.2 – Agente Etiológico	22
1.3 – Transmissão e manifestação da doença meningocócica	27
1.4 – Diagnóstico e tratamento	31
1.5 – Produção de vacinas contra meningite	32
1.6 – O controle de qualidade de vacinas e a vigilância sanitária	37
1.7 – Validação	41
2 – Objetivos	44
2.1 – Objetivo Geral	44
2.2 – Objetivos Específicos	44
3 – Materiais e Métodos	45
3.1 – Desenvolvimento de Experimentos	45
3.2 – Material	45
3.2.1 - Cepa de trabalho	45
3.2.2 - Animais	45
3.2.3 - Padrões	46
3.2.4 - Reagentes	46
3.2.5 - <i>Kits</i> comerciais e tira para eletroforese bidimensional	47
3.2.6 - Equipamentos e acessórios	47
3.3 – Métodos	48

3.3.1 - Produção de OMV	48
3.3.2 - Determinação do teor de proteínas totais – <i>DC Protein Assay Bio-Rad®</i>	51
3.3.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)	52
3.3.4 - Eletroforese Bidimensional	53
3.3.4.1 - Otimização das condições	53
3.3.4.2 - Preparo das amostras	54
3.3.4.3 - Condições eletroforéticas	54
3.3.4.4 - Seleção e descoloração das bandas (<i>spots</i>) para a hidrólise trípica	55
3.3.4.5 - Hidrólise trípica das bandas (<i>spots</i>)	56
3.3.4.6 - Espectrometria de massas	57
3.3.4.7 - Identificação dos <i>spots</i>	57
3.3.5 - Imunização dos camundongos com a OMV produzida no laboratório para a produção de anticorpo policlonal	58
3.3.6 - Determinação da soro conversão em camundongos	60
3.3.7 - Immunoblot	61
3.3.8 - Determinação do teor de LOS	62
3.3.8.1 - Preparo da amostra	62
3.3.8.2 - Condições cromatográficas	62
3.3.9 - Validação da metodologia de quantificação de KDO por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada	63
3.3.9.1 - Linearidade	64
3.3.9.1.1 - Preparo da curva de calibração para avaliação da Linearidade	64

do método	
3.3.9.1.2 - Preparo do padrão de LOS	64
3.3.9.1.3 - Avaliação da linearidade Dia 1	65
3.3.9.1.4 Avaliação da linearidade Dia 2 e 3	65
3.3.9.1.5 - Seletividade	66
3.3.9.1.6 - Precisão	67
3.3.9.1.7 - Repetitividade	67
3.3.9.1.8 - Precisão intermediária	68
3.3.9.1.9 - Exatidão	68
3.3.9.1.10 - Limite de detecção e limite de quantificação	68
3.3.10 - Cálculos estatísticos empregados na validação	69
3.3.10.1 - Estudos de linearidade	69
3.3.10.2 - Avaliação da homocedasticidade do método	70
3.3.10.3 - Precisão	71
3.3.10.4 - Teste de Cochran	72
4 – Resultados e Discussões	75
4.1 – Produções de OMV	75
4.2 - Eletroforese bidimensional	79
4.3 - Hidrólise trípica, espectrometria de massas e identificação dos spots	87
4.4 Determinação da soro conversão em camundongos	93
4.5 - Revelação do gel de eletroforese bidimensional por imunoblot	95
4.6 - Determinação do teor de LOS	97
4.7 - Validação da metodologia de quantificação de kdo por cromatografia	101

líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada.	
4.7.1 - Linearidade	101
4.7.1.1 - Avaliação da homocedasticidade do método	101
4.7.2 - Seletividade	108
4.7.3 - Precisão	110
4.7.4 - Exatidão	112
4.7.5 - Limite de detecção e quantificação	113
5 - Conclusões	116
6 – Referências Bibliográficas	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A meningite meningocócica é uma doença que apresenta registros muito antigos, tendo sido descritos os primeiros casos clínicos no século XVI (SKINNER, 1970). Embora as descrições clínicas sejam desta época, os principais sintomas foram descritos por Vieusseaux (VIEUSSEUX, 1804), tendo sido o microorganismo causador da doença identificado em 1887 por Weichselbaum (WEICHLBAUM, 1887).

Inicialmente, este microrganismo foi chamado de *diplococcus intracelularis* e posteriormente foi inserida no gênero *Neisseria* (FREDLUND, 1993).

Após a Segunda Guerra Mundial, em 1945, as epidemias causadas por diferentes sorogrupos foram descritas em todo o mundo. Estas epidemias afetaram indivíduos de todas as faixas etárias e apresentaram regularidade no aparecimento. Desde então períodos epidêmicos com intervalos de aproximadamente de 10 anos têm atingido diversas regiões da África.

Já na década de 70, cepas de *Neisseria meningitidis* (Nm) emergiram na Europa atingindo as Américas. No Brasil, a meningite meningocócica foi observada pela primeira vez no município de São Paulo em 1906 (BRAZILIAN EPIDEMIOLOGICAL VIGILANCE CENTER, 2004).

Essa doença teve maior impacto sobre a população a partir de 1971, época em que uma grande epidemia ocasionada pelos sorogrupos A e C atingiu o país. Quatro anos depois o número de casos teve um decréscimo retornando a níveis endêmicos (IVERSSON, 1976).

A década de 80 foi marcada por um início de baixa incidência da doença ocasionada pelo sorogrupo B e no final por epidemias diversas em vários pontos do país. Na década de 90 ocorreu uma diminuição nos casos de meningite B e um aumento significativo de casos de meningite C (WEISS et al., 2001). No período de 1980 ao ano 2000, foram notificados cerca de 80.000 casos da doença, sendo o estado de São Paulo o que mais se sobressaiu, representando 35% dos casos. A partir de 2002 observou-se em alguns estados brasileiros, um aumento da incidência do sorogrupo C e uma

diminuição do sorogrupo B. No entanto a letalidade do sorogrupo B tem sido nitidamente mais expressiva quando comparada com o sorogrupo C (CARVALHANAS, 2005), com exceção do estado da Bahia, onde no final de 2009, um surto provocado pelo sorogrupo C aumentou a letalidade da doença em até 50% em alguns municípios do estado. Os dados a respeito da distribuição global dos sorogrupos da doença meningocócica podem ser observados na figura 1.

Figura 1: Distribuição global dos sorogrupos de *Neisseria meningitidis*.



Fonte: HARRISON (2009)

Estima-se a ocorrência de pelo menos 500 mil casos de *doença meningocócica* (DM) por ano no mundo, com cerca de 50 mil óbitos. É uma doença de evolução rápida e com alta letalidade, que varia de 7 a 70%. Mesmo em países com assistência médica adequada, a DM pode ter uma letalidade de até 40%. Geralmente acomete crianças e adultos jovens, mas em situações epidêmicas, a doença pode atingir pessoas de todas as faixas etárias (BARATA, 1988).

Dados epidemiológicos revelaram que a DM ocorre de forma endêmica em todos os países do mundo, podendo se apresentar também de forma epidêmica. Nos países industrializados, a incidência da DM é baixa, com 1 a 3

casos por 100.000 habitantes. No entanto, nos países em desenvolvimento essa taxa se encontra entre 10 a 25 casos por cada 100.000 habitantes (BRICKS, 2001). Na região da África, conhecida como cinturão da meningite, a incidência é bem alta, chegando a atingir de 100 a 800 casos por 100.000 habitantes (WILDER-SMITH, 2008).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

A meningite pode ser causada por diversos agentes etiológicos, como bactérias, vírus, fungos, dentre outros. As meningites de origem infecciosa, principalmente as causadas por bactérias e vírus, são as mais importantes sob o ponto de vista da saúde pública. Este fato se deve a grande ocorrência de casos, o potencial de surtos e o risco para a população (TRABULSI, 2005).

Os principais agentes bacterianos causadores de meningite são a *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Haemophilus influenzae*. Na tabela 1, abaixo são apresentadas as características de cada um destes agentes bacterianos.

Tabela 1: Resumo das características dos agentes bacterianos causadores de meningite.

AGENTE BACTERIANO CAUSADOR DE MENINGITE	CARACTERÍSTICAS
<i>Neisseria meningitidis</i>	Bactéria Gram-negativa, em forma de coco. Possui diversos sorogrupos de acordo com o antígeno polissacarídico da cápsula. Os mais frequentes são os sorogrupos A, B, C W ₁₃₅ e Y. Podem também ser classificados em sorotipos e subtipos, de acordo com o antígeno protéico da parede externa do meningococo.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéria Gram-positiva com característica morfológica esférica (cocos), disposta aos pares. É alfa-hemolítico e não agrupável, possuindo mais de 90 sorotipos capsulares.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Bacilo não formado de esporos, sem flagelos e que não produz toxinas. É uma espécie aeróbica estrita, necessitando de oxigênio para crescer e se multiplicar. Tem forma de bastonete, medindo de 1 a 4 micra.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Bactéria Gram negativa que pode ser classificada em 6 sorotipos (a,b,c,d,e,f), a partir da diferença antigênica da cápsula polissacarídica.

As meningites virais são representadas principalmente pelos enterovírus. Nesse grupo, estão incluídas as 3 tipos dos poliovírus, 28 tipos de echovírus, 23 tipos do vírus coxsackie A, 6 do vírus coxsackie B e 5 outros enterovírus.

Dentre os agentes etiológicos apresentados anteriormente, o mais frequente é a *Neisseria meningitidis*.

A bactéria *Neisseria meningitidis* é uma espécie bacteriana do gênero *Neisseria*, que faz parte da família *Neisseriaceae*, tendo patogenicidade para o homem, sendo este o seu único reservatório natural (LANNETTE et al., 1985)

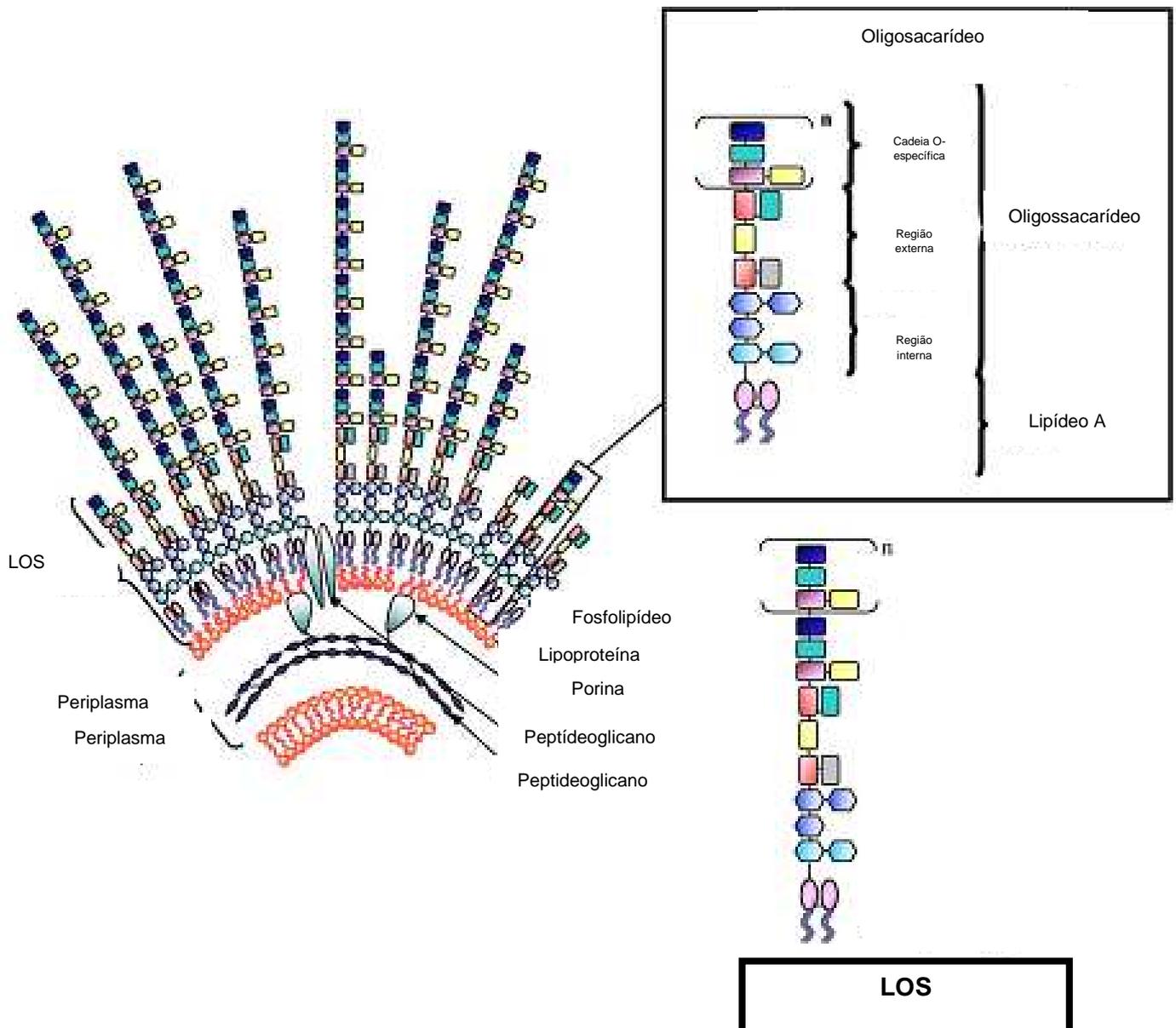
Como apresentado na tabela 1, as *Neisserias* são cocos Gram-negativos que se apresentam aos pares na forma de diplococos. São microrganismos microaerófilos, oxidases positivas, produzem ácidos a partir de carboidratos como a glicose, maltose e lactose (STUART, 1987).

Estruturalmente, a *Neisseria meningitidis* se assemelha a outras bactérias Gram-negativas, possuindo uma membrana interna ou citoplasmática e outra externa, separadas por uma camada de peptidoglicano, também chamada de parede celular.

A membrana externa é revestida por uma cápsula polissacarídica, que confere resistência contra a fagocitose e lise mediada por complemento. Essa cápsula, junto com outros componentes da membrana externa, representam os fatores de virulência desse agente infeccioso.

Outro componente da membrana externa associado à virulência é o LOS. Quimicamente, essas moléculas são lipooligossacarídeos (LOS), constituídos por uma cadeia O-específica, um centro oligossacarídeo e um componente lipídeo terminal, chamado de lipídeo A, como apresentado na Figura 2 (CAROFF & KARIBIAN, 2003).

Figura 2: Representação esquemática do envelope celular de bactérias Gram negativas. À direita é mostrada a estrutura do lipopolissacarídeo.



Fonte: CAROFF & KARIBIAN, 2003.

Na membrana externa, existem também diversas proteínas, envolvidas na patogênese da DM. Esta membrana é revestida por uma cápsula de polissacarídeos que apresenta relação direta com a patogenicidade (CAROFF & KARIBIAN, 2003).

Desta forma, a organização taxonômica de *N. meningitidis* é baseada no polissacarídeo capsular, nas proteínas de membrana externa (OMP) e nos lipopolissacarídeos (LPS) ou lipooligossacarídeos (LOS) (FREDLUND, 1993).

A composição antigênica da cápsula polissacarídica permite a classificação do meningococo em 13 diferentes sorogrupos: A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z, 29E. Os sorogrupos A, B, C, Y e W135 são responsáveis pela maior parte dos casos da doença, infectando apenas humanos (FRASCH et al., 1985). Dados da literatura afim, ainda revelam que existem algumas cepas não-grupáveis, já que não apresentam antígenos polissacarídicos capsulares (CRAVEN et al., 1982). As cápsulas das cepas dos sorogrupos B e C são constituídas por homopolímeros de ácido siálico, ligados por ligações α - 2,8 e α - 2,9 respectivamente. Os outros sorogrupos são formados por copolímeros de ácido siálico e monossacarídeos, ligados a glicose, no caso do sorogrupo Y e a galactose no caso do sorogrupo W135 (PELTOLA, 1998).

Os meningococos são também classificados em sorotipos e sorosubtipos, de acordo com a composição antigênica das proteínas de membrana externa (OMP) (CAROFF & KARIBIAN, 2003).

A membrana externa apresenta de três a cinco proteínas presentes em maior quantidade, divididas em 5 classes estruturais, classificadas desta forma de acordo com o seu peso molecular, estabelecido por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). As massas moleculares destas proteínas são de 46, 41, 38, 33 e 28 kDa e elas podem ser classificadas então em classe 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente (TSAI et al., 1981; POOLMAN, 1995). Desta forma, os sorotipos e sorosubtipos são determinados a partir das diferenças entre estas OMPs. A sorotipagem é feita a partir da diferença entre as proteínas de classe 2/3 e o sorosubtipo é determinado pela diferença da proteína de classe 1. As proteínas de classe 2 e 3 nunca são expressas simultaneamente. Estas proteínas atuam como porinas e controlam o fluxo de íons na bactéria.

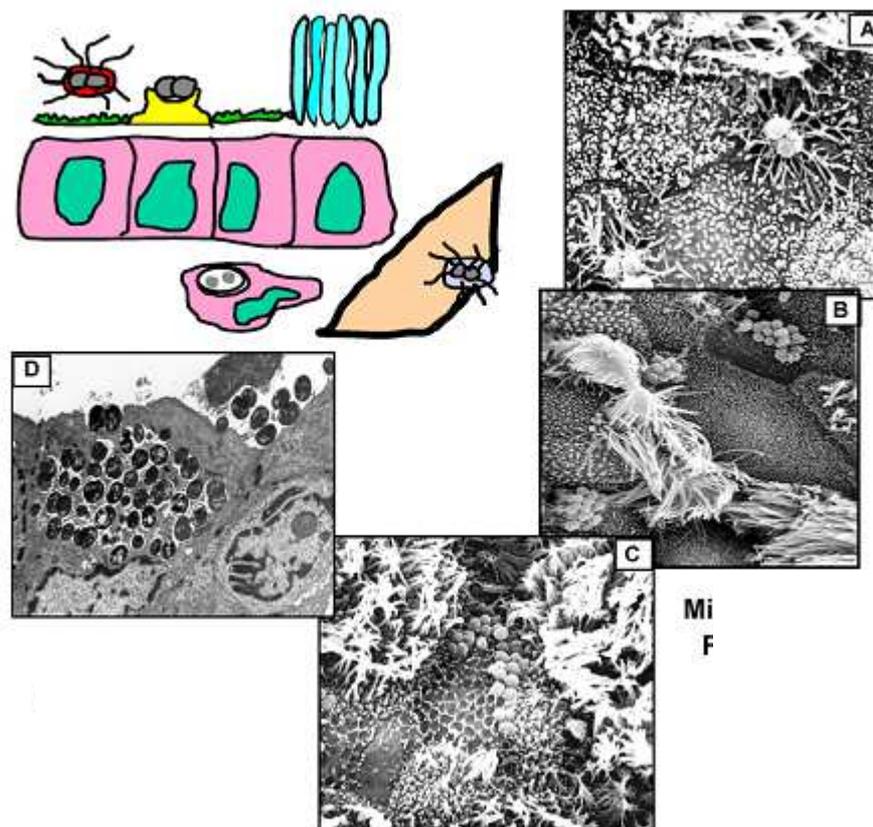
Finalmente, o imunotipo é determinado a partir da estrutura oligossacarídica do LPS ou LOS (ZOLLINGER et al., 1991a; MORAN et al., 1994). Até o momento são conhecidos 12 imunotipos, classificados de L1 a L12.

1.3 TRANSMISSÃO E MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA MENINGOCÓCICA

A *Neisseria meningitidis* pode causar inflamação nas membranas que revestem o sistema nervoso central, dando origem à meningite meningocócica ou pode causar uma infecção generalizada, dando origem a meningococemia (HARRISON, 2006). A doença meningocócica é uma infecção bacteriana aguda, rapidamente fatal.

A infecção meningocócica inicia-se com a colonização da nasofaringe humana, seguida da passagem da bactéria para corrente circulatória e, no caso de meningite invasão das meninges (HARRISON, 2006). Na Figura 3, são apresentadas as etapas iniciais da colonização meningocócica e a invasão da nasofaringe humana.

Figura 3: Esquema da colonização meningocócica. A - Adesão e introdução de microvilosidades das células, B – Formação da microcolonização, C – Formação da placa cortical e fechamento da aderência, D – Invasão das células epiteliais humanas.



Fonte: HARRISON, 2006.

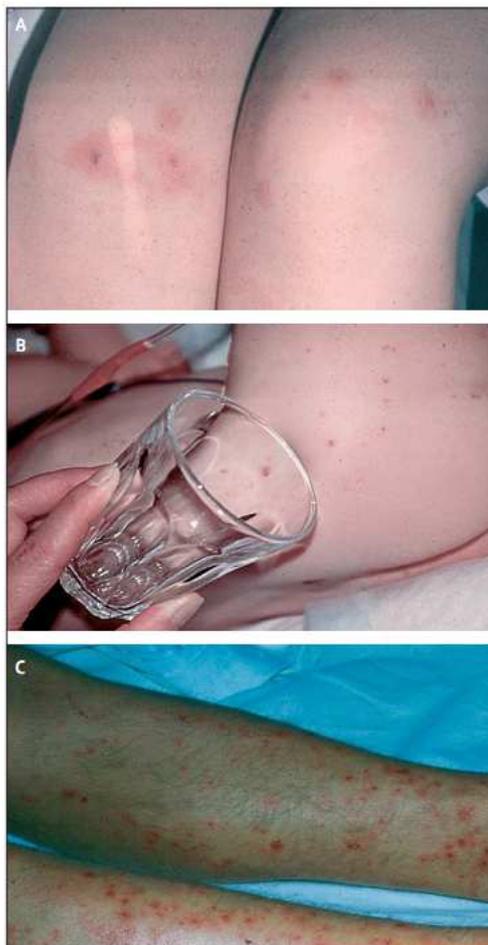
A *N. meningitidis*, coloniza a nasofaringe em cerca de 5 a 30% da população em áreas não endêmicas, sem causar doença. A transmissão do meningococo ocorre através do contato direto com secreções da nasofaringe do portador assintomático ou do doente (GIRARD et al., 2006).

A *Neisseria meningitidis* é a maior causadora da meningite e septicemia em crianças e adolescentes. Embora a infecção meningocócica inicie-se com a colonização da nasofaringe humana, por razões ainda desconhecidas, em um grande número de casos, a bactéria pode atravessar o epitélio e chegar até a corrente sanguínea, causando septicemia. A partir do sangue, o meningococo é capaz de infectar as meninges e causar a meningite (GIRARD et al., 2005).

A doença meningocócica possui uma evolução rápida podendo levar a morte em menos de dois dias após sua instalação. As manifestações iniciais são febre alta, prostração, dor de cabeça, vômitos, petéquias, dor e dificuldade

na movimentação do pescoço. O maior risco da doença é a diminuição rápida da pressão arterial resultando em um funcionamento inadequado dos órgãos vitais (GIRARD et al., 2005). Na figura 4 estão apresentadas as erupções cutâneas causadas pela doença meningocócica.

Figura 4: Erupções cutâneas causadas pela doença meningocócica. A – Macular, B e C – Petequial.

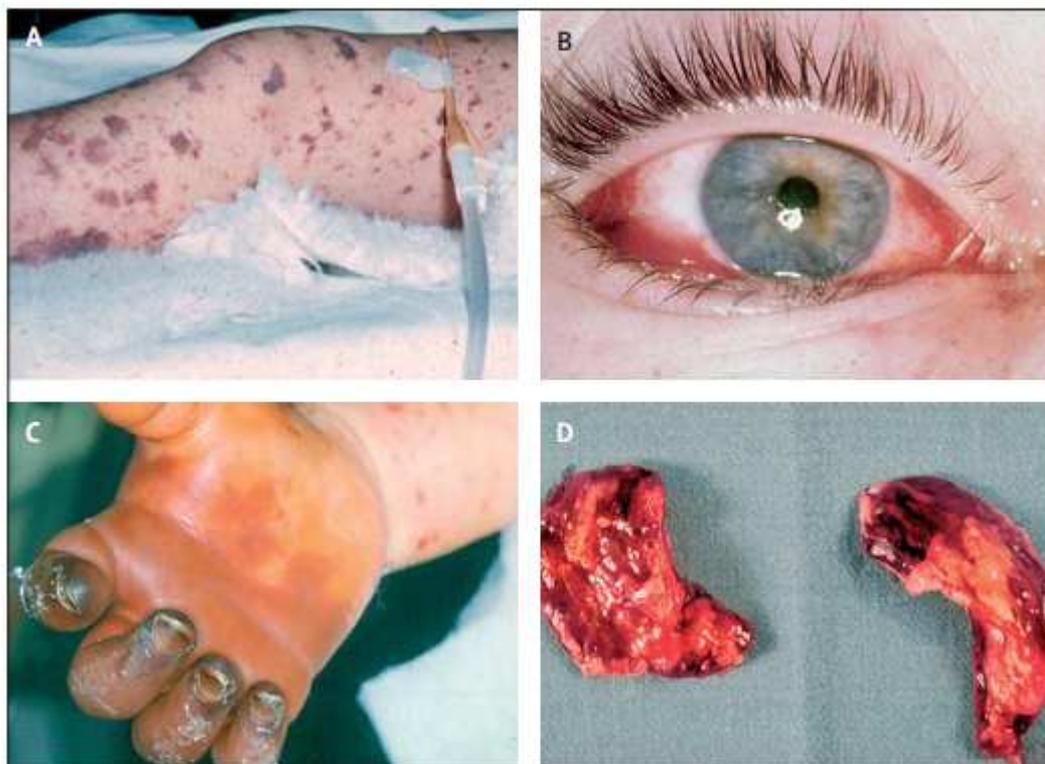


Fonte: STEPHENS, 2007.

A incidência da doença meningocócica (DM) é bastante elevada tanto em países em desenvolvimento quanto em países industrializados e embora existam terapias a base de antibióticos, a taxa de mortalidade ainda permanece alta. Cerca de 5 a 10% dos indivíduos evoluem para óbito apesar do tratamento. Das pessoas que sobrevivem, 9 a 11% ficam com algum tipo de seqüela permanente (surdez, paralisias, convulsões, amputação de extremidades) (HARRISON, 2006). Desta forma, a DM representa um tipo de

doença que causa grande impacto sobre a saúde da população. Na figura 5 são apresentados quadros clínicos, de septicemia meningocócica fulminante.

Figura 5: Septicemia meningocócica fulminante. A – Septicemia meningocócica fulminante com equimoses, B – Olho com hemorragia intra-ocular durante a septicemia meningocócica fulminante, C – Trombose e gangrena causadas por septicemia meningocócica fulminante, D – Hemorragia das glândulas supra renais causadas por septicemia meningocócica fulminante.



Fonte: STEPHENS, 2007.

A partir de todos os surtos epidêmicos ocorridos e com o objetivo de minimizar os efeitos causados pelas doenças meningocócicas, várias vacinas foram desenvolvidas e usadas como prevenção.

Inicialmente, as vacinas disponíveis apresentavam proteção por um tempo limitado, além de somente prevenir contra o sorogrupo contido na mesma e ainda com reduzida eficácia em crianças de baixa idade, que constituem o grupo de risco, visto que os recém-nascidos adquirem anticorpos maternos IgG por via transplacentária contra alguns sorogrupos de meningococo e a partir do terceiro mês de vida esses anticorpos começam a ser destruídos, tornando a criança suscetível as infecções (SANBORN, 1987).

Atualmente, são encontradas disponíveis as vacinas contra os sorogrupos A, C, AC e a tetravalente AC Y W135, se destacando a busca pelo desenvolvimento da vacina específica e eficaz contra o sorogrupo B, pois a pouca imunogenicidade desse grupo dificulta a obtenção de uma vacina (REQUEJO, 1997).

1.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico inicial da doença meningocócica consiste em uma avaliação clínica, em que é apreciada a história do paciente e também é feito o exame físico da pessoa. Suspeitando-se de meningite, o tratamento deve ser imediato antes mesmo que o diagnóstico laboratorial esteja pronto, visto o grande risco de letalidade da doença (CARVALHANAS, 2005).

Um grupo de testes laboratoriais iniciais (exemplo: hemograma, eletrólitos, proteína C reativa, e culturas) deve ser realizado quando houver suspeita de meningite. Além disso, sempre que possível, deve-se realizar a punção lombar e o líquido cefalorraquidiano (LCR) deverá ser enviado para análise de glicose, de proteína, e contagem de células com diferencial e cultura.

O diagnóstico definitivo depende do exame do LCR, cujos achados característicos incluem a pleocitose e também hiperproteínoorraquia, a hipoglicorraquia e a cultura positiva (MANTESE et al, 2002). Segundo Donalisio, (2004), a pesquisa de polissacárideos capsulares no liquor, através das técnicas imunológicas de contra-imunoeletroforese (CIEF) ou aglutinação do látex, são bastante empregadas.

A busca de métodos mais rápidos, sensíveis e específicos levou ao desenvolvimento de técnicas moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Então, a detecção do DNA de *N. meningitidis* pela PCR é cada vez mais utilizada para o diagnóstico de DM, e é uma importante ferramenta para tipagem e caracterização de isolados. Os métodos de tipagem 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).

O tratamento é realizado por antibioticoterapia e deve ser iniciado logo quando são 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 dizer que os contatos dos pacientes acometidos com DM devem receber tratamento antimicrobiano profilático adequado (DE FILLIPIS, 2005).

A droga de escolha para o tratamento da meningite meningocócica é a penicilina. Em condições normais de saúde a penicilina não é capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (BHE), porém em pacientes portadores de meningite meningocócica as meninges se encontram inflamadas e a penicilina consegue penetrar a BHE rapidamente. Vale ressaltar que a resistência do meningococo às penicilinas leva a um aumento da utilização de antimicrobianos de amplo espectro como a ceftriaxona e a vancomicina (CARVALHANAS, 2005).

1.5 A PRODUÇÃO DE VACINAS CONTRA MENINGITE

As primeiras tentativas de produção de vacinas contra meningite se basearam na utilização de células inteiras de meningococos, mortas pelo calor. Estas preparações apresentaram níveis muito elevados de reações adversas, fato que se deveu principalmente ao alto conteúdo de endotoxina (MORLEY & POLLARD, 2001). Posteriormente, em 1930 Ferry e colaboradores desenvolveram estudos de uma vacina baseada em exotoxina de meningococos, numa tentativa de repetir o sucesso alcançado pela vacina toxóide diftérica (MORLEY & POLLARD, 2001). Estes estudos demonstraram a redução da doença meningocócica em jovens do sexo masculino, mas não provaram conclusivamente a imunogenicidade, a eficácia e a segurança desta exotoxina (MORLEY & POLLARD, 2001).

A primeira produção vacinal a ter sucesso, se deu a partir da purificação dos respectivos polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* (COBB, et al.

2004). Utilizando esta estratégia de produção foram desenvolvidas vacinas para os sorogrupos A, C, Y e W₁₃₅ (GRIFFISS et al., 1991).

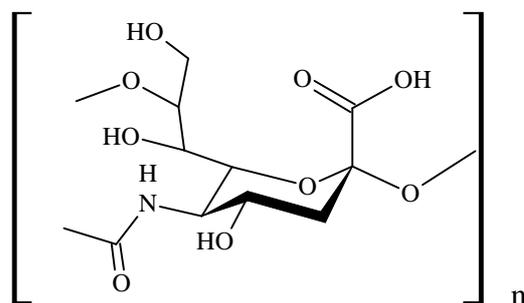
Com relação à capacidade imunogênica das vacinas polissacarídicas, vários estudos foram desenvolvidos, no sentido de explicar a falta de imunidade em crianças e a imunidade transiente apresentada por estas vacinas. Concluiu-se então, que os polissacarídeos são antígenos que atuam de maneira independente das células T, o que faz com que crianças com idade menor do que dezoito meses, que constituem o grupo de risco, não desenvolvam imunidade e explica a imunidade transiente apresentada em adultos (BEJUNE et al., 1991; TAPPERO et al., 1999).

Para melhorar as propriedades imunológicas das vacinas polissacarídicas, estratégias de conjugação foram adotadas (ROBBINS & SCHNEERSON, 1990). A conjugação tem por objetivo potencializar a resposta imune, principalmente em crianças de baixa idade. Por esta reação, os polissacarídeos são conjugados, isto é ligados covalentemente, a um antígeno protéico, capaz de induzir imunidade em crianças com menos de 18 meses de vida. Empregando esta estratégia a primeira vacina conjugada que foi desenvolvida foi à vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b (ELLIS & GRANOFF, 1994).

Atualmente, outras vacinas conjugadas já se encontram disponíveis, é o caso da vacina heptavalente contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* sorogrupo C. Além disso, encontra-se em etapa final de ensaio clínico a vacina tetra-valente conjugada contra os sorogrupos A, C,Y, W135 de *Neisseria* (RAMSAY et al., 2001).

Em oposição aos sorogrupos A, C, Y e W135, o polissacarídeo do sorogrupo B de *Neisseria* não é capaz de estimular a produção de anticorpos em humanos. O Polissacarídeo B é formado por unidades repetidas de ácido siálico, ligados entre si por ligações α (2-8) (Figura 6). A ausência de resposta imune a este polissacarídeo se deve a similaridade estrutural existente entre ele e os polissacarídeos presentes na superfície dos neurônios humanos (SANBORN, 1987).

Figura 6: Monômero de ácido siálico presente na estrutura do polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B



Fonte : O autor.

Com o objetivo de solucionar este problema, algumas estratégias de produção de vacina contra *N. meningitidis* sorogrupo B foram testadas. Tentou-se inicialmente adsorver o polissacarídeo B ao hidróxido de alumínio, adjuvante utilizado em produção de vacinas (FRASCH et al., 1994), porém os resultados não foram satisfatórios.

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 (BRUGE et al., 2004), tal estratégia também não apresentou resultados satisfatórios.

As alternativas para a imunização contra a meningite B foram então procuradas. Os estudos realizados com o soro de pacientes portadores de *N. meningitidis* B demonstraram a presença de anticorpos contra as proteínas da membrana externa (OMP) da bactéria e contra, o LOS, que são componentes da membrana externa de Gram-negativas (AABERG et al., 2005). Desta maneira, 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*) (AABERG et al., 2005).

Com relação à composição protéica da vesícula, estudos de caracterização foram realizados e tornou-se possível classificar estas proteínas em 5 classes, 1, 2, 3, 4 e 5. Esta classificação foi feita de acordo com o peso molecular das proteínas, sendo que as proteínas de classe 1, apresentam

menores pesos moleculares e as proteínas de classe 5, apresentam maiores pesos moleculares (CULLEN et al., 2004).

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 (URWIN et al., 2004). Desta maneira a grande variabilidade estrutural destas proteínas representa mais um desafio para as estratégias de desenvolvimento de vacinas contra *N.meningitidis* B.

Apesar destas dificuldades, algumas vacinas utilizando as OMPs foram desenvolvidas, testadas e conduzidas a uso clínico.

As primeiras tentativas para a produção de vacinas baseadas em proteínas de membrana externa datam da década de 70 do século passado. Estas vacinas foram baseadas na retirada do LPS da proteína de membrana externa através do tratamento com um tipo de detergente. A partir deste procedimento, as OMPs foram precipitadas para produzir agregados. Estas preparações apresentaram resultados satisfatórios em animais, mas falharam na indução de anticorpos em humanos (FRASCH, 1995; CLAASEN et al., 1996). Acredita-se que o resultado não satisfatório se deva a desnaturação protéica ocasionada pela formação de agregados de OMP.

Para solucionar este problema, foram desenvolvidas vacinas com proteínas dispostas na sua forma nativa e na forma de vesículas de membrana externa (OMV) (ZOOLLINGER et al., 1979). Estas vesículas, então, apresentaram imunogenicidade mais significativa do que os agregados de OMP.

A partir desta tecnologia, duas principais vacinas foram desenvolvidas na década de 80. Uma destas vacinas foi desenvolvida em resposta ao surto da doença meningocócica, ocorrido em Cuba (SIERRA, et al., 1991) e a outra na Noruega (BJUNE et al., 1991). A vacina cubana foi produzida pelo Instituto Finlay a partir da cepa B:4:P1.19,15. Esta vacina é combinada, denominada VA-MENGOC-BC®, capaz de imunizar contra os sorogrupos B e C e é constituída pelo sorogrupo C e por uma preparação de OMP de alto peso molecular, adsorvida ao hidróxido de alumínio (SIERRA et al., 1991). A administração em Cuba se deu em duas doses utilizadas em um programa de

vacinação para indivíduos na faixa de três meses a dezenove anos de idade, no ano de 1988, apresentando eficácia de 95%, contribuindo assim para o rápido declínio da epidemia meningocócica cubana (RODRIGUEZ ET AL., 1999).

No Brasil, na década de 90 do século passado foi utilizada a mesma vacina produzida por Cuba, baseada no sorotipo B:4:P1.19,15, prevalente em Cuba (SIERRA et al., 1991). Embora este sorotipo também seja prevalente no Brasil, aqui em nosso país existe uma variedade maior de outros sorotipos (JESSOURON et al., 2004). Desta maneira os resultados obtidos com a vacinação conseguiram imunidade de apenas 74% da população vacinada (DE MORAES et al., 1992; MILAGRES et al., 1994; NORONHA et al., 1995).

Já na vacina produzida na Noruega, pelo *Norwegian National Institute for Public Health* (NIPH) foi utilizado um clone ET-5 (B: 15P.1.7,16). Esta vacina é monovalente, produzida por vesículas de membrana externa adsorvidas ao hidróxido de alumínio (BEJUNE et al., 1991). Esta vacina foi administrada em duas doses, no período de 1988 a 1991 em crianças de vinte e nove meses, apresentando eficácia de apenas 57%, além de apresentar efeito de curta duração (BEJUNE et al., 1991; SIERRA et al., 1991).

Com relação à capacidade imunológica destas vacinas, sabe-se que a imunogenicidade produzida a partir da OMV está diretamente relacionada com a proteína de membrana externa PorA, proteína classe 1. Estas proteínas apresentam alta variabilidade em sua estrutura primária e, em decorrência disto as vacinas produzidas por esta tecnologia apresentaram uma baixa capacidade de controle endêmico contra a doença meningocócica causada pelo sorogrupo B (PIZZA et al., 2000).

No Brasil, algumas Instituições de pesquisa, como o Instituto Bio-Manguinhos-Fiocruz e o Instituto Butantan têm trabalhado no desenvolvimento de vacinas com a mesma tecnologia da vacina cubana e norueguesa, utilizando cepas prevalentes no Brasil.

Outra linha de investigação se destina a buscar um antígeno universal para todas as cepas de meningococos. Com o avanço da tecnologia genética e com a era pós genômica, algumas tentativas têm sido desenvolvidas no sentido de produzir uma preparação candidata à vacina que seja capaz de conferir

proteção contra a diversidade de cepas de *N. meningitidis* B (CAPECCHI et al., 2004).

O sequenciamento do genoma de *Neisseria* possibilitou a predição de seiscentos antígenos potenciais, dos quais, trezentos e cinquenta já foram expressos em *E. coli*, purificados e utilizados na imunização de ratos. Destes vinte e nove foram capazes de induzir a produção de anticorpos. Esta nova tecnologia associada aos avanços no entendimento da base molecular da resposta imune promete novas preparações candidatas a vacinas capazes de produzir proteção para a diversidade de cepas existentes (CAPECCHI et al., 2004).

Desta forma, o sequenciamento do genoma da cepa virulenta MC58 de *N. meningitidis* sorogrupo B, deu origem ao que se chama de vacinologia reversa. Este termo indica que a partir da identificação de segmentos de DNA de *Neisseria* é possível prever quais são os que apresentam a capacidade de gerar anticorpos bactericidas (RAPPUOLI et al., 2002).

O desenvolvimento de vacinas utilizando a abordagem da vacinologia reversa só é possível caso o genoma do patógeno já esteja sequenciado. O sequenciamento do genoma fornece uma espécie de catálogo de praticamente todos os antígenos protéicos que o patógeno pode expressar (RAPPUOLI, 2000).

1.6 O CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS E A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A gravidade das doenças meningocócicas, a ocorrência de epidemias, a possibilidade da disseminação de cepas muito 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 de qualidade de vacinas constitui um instrumento de saúde pública da maior importância (DA 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. A garantia do direito à saúde não pode prescindir da garantia do acesso aos insumos necessários para viabilizá-lo. É responsabilidade das autoridades sanitárias nacionais assegurarem que os imunobiológicos disponíveis no Brasil, de origem nacional ou não, sejam seguros, de qualidade e eficácia comprovadas (BRASIL, 1977).

A preocupação com a qualidade dos imunobiológicos se deve, dentre outros motivos, ao fato de que tais produtos são aplicados em grupos de pessoas sadias e as campanhas expõem toda uma faixa etária da população ao insumo. Diante deste contexto, a vigilância sanitária de vacinas apresenta uma grande importância no cenário nacional e internacional. No Brasil, todas as vacinas utilizadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI), são analisadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Um dos objetivos principais do PNI é oferecer todas as vacinas, definidas como prioridade do SUS, 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 de qualidade lote a lote destes produtos faz parte das atividades do INCQS, onde são realizados os ensaios preconizados por normas nacionais e internacionais (BRASIL, 1993). Além do controle de qualidade lote a lote, deve-se destacar também a importância do INCQS no processo de concessão do registro sanitário de imunobiológicos, que constitui uma das ferramentas que a vigilância sanitária dispõe para controlar a entrada desses produtos e formar a base das informações sobre eles para o Sistema de Vigilância Sanitária.

Dentro deste cenário, no sentido de atender as prioridades do SUS, é possível perceber um grande investimento em pesquisa e desenvolvimento (P & D) para novas vacinas. O instrumento legal que garante o interesse das empresas nessa área são as patentes, que permitem um monopólio de 20 anos da vacina desenvolvida. Os pré-requisitos para a concessão de uma patente são novidade, atividade inventiva e aplicação industrial, conceitos presentes em todas as legislações de propriedade industrial. Estas questões regulatórias, que envolvem registros e patentes para vacinas contra meningite B foram

investigadas e deram origem a um trabalho, submetido para publicação na Revista do Instituto Adolfo Lutz.

Com relação aos ensaios preconizados, nas normas nacionais e internacionais, disponíveis para as vacinas antimeningocócicas pode-se verificar que para as vacinas 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. Mesmo havendo um consenso apenas a Farmacopéia Européia apresenta monografia para estes produtos. A Farmacopéia Americana apresenta recomendações gerais para vacinas bacterianas e a Farmacopéia Brasileira não contempla monografias específicas para vacinas contra meningites bacterianas.

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, torna-se uma preocupação cada vez maior.

Na Tabela 2, é apresentado o resumo das recomendações encontradas na Farmacopéia Européia para estes produtos (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2011).

Tabela 2: Resumo de ensaios recomendados pela Farmacopéia Européia 7^o edição, 2011 para vacinas contra meningites bacterianas.

PRODUTO	ENSAIO
Vacinas polissacarídicas Antimeningocócicas	Distribuição de peso molecular Teor de polissacarídeo Teor de umidade residual Teste de identidade Teste de esterilidade Endotoxina – Método biológico
Vacina contra Haemophilus tipo b - conjugada	Distribuição de peso molecular Teor de polissacarídeo Teor de polissacarídeo livre Teor de umidade residual Teste de identidade Teste de esterilidade Endotoxina – Método biológico
Vacina antimeningocócica C - conjugada	Distribuição de peso molecular Teor de polissacarídeo Teor de polissacarídeo livre Teor de umidade residual Teor de alumínio Teste de identidade Teste de esterilidade Endotoxina – Método biológico
Vacina antimeningocócica A – conjugada	Não apresenta monografia
Vacina antimeningocócica tetravalente A, C, Y, W135 – conjugada	Não apresenta monografia
Vacina antimeningocócica B	Não apresenta monografia

Como pode ser observado na tabela 2, ainda falta consenso internacional com relação aos ensaios empregados no controle de qualidade de vacinas antimeningocócicas conjugadas, assim como no controle de vacinas antimeningocócicas B, produzidas a partir de OMVs.

Embora ainda não exista monografia oficial para as vacinas conjugadas A e tetravalente, o sucesso da vacina antimeningocócica C conjugada, impulsionou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a promover uma discussão a respeito das normas de produção e controle de qualidade de

vacinas antimeningocócicas conjugadas, que se encontram em desenvolvimento (WHO, 2006). Nas recomendações propostas pela OMS, estão contempladas a vacina antimeningocócica tetravalente A, C, Y, W₁₃₅ conjugada, recentemente licenciada em alguns países, e a vacina antimeningocócica A conjugada, que se encontra em etapa final de ensaios clínicos.

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

Com relação à vacina contra meningite B, a preocupação com risco para a saúde pública aumenta em função da elevada toxicidade apresentada por estas preparações vacinais (ANDERSEN et al., 1997).

A endotoxina é a principal responsável pela toxicidade de bactérias Gram-negativas, daí a grande importância da sua quantificação em preparações vacinais.

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

Desta forma, em função da ausência de referências para vacinas antimeningocócicas conjugadas, tetra-valente e contra o sorogrupo B, e mediante a sua importância para a saúde pública, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de metodologias aplicadas ao controle de qualidade desses produtos.

Os ensaios empregados no controle de qualidade de vacinas contra meningite B ainda representam um desafio, por isso, necessita-se desenvolver e implementar ensaios físico-químicos que sejam capazes de demonstrar a consistência de produção e assim avaliar a qualidade das vacinas utilizadas em rotinas de imunização.

O desenvolvimento de ensaios empregados no controle de qualidade de vacinas contra meningite B é um processo que em alguns casos envolve uma etapa de validação da metodologia, para que a mesma seja utilizada nas rotinas de análise do Programa Nacional de Imunizações.

1.7 VALIDAÇÃO

A validação neste trabalho tem por objetivo demonstrar a qualidade das medições químicas, através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos resultados. Quando os dados analíticos não são confiáveis, eles podem conduzir a decisões desastrosas e graves prejuízos financeiros. Sendo assim, o desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação. A validação de um método é um processo que envolve várias etapas, que começa com o planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do desenvolvimento da metodologia.

Sob o ponto de vista regulatório, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação da metodologia analítica, quando esta for desenvolvida e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que não diretrizes a serem adotadas no processo de validação.

Além disso, existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implementação de métodos analíticos validados. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional.

No Brasil, existem duas agências credenciadas para verificar a competência de laboratórios de ensaios, uma é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e a outra é o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estas agências disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, que são a resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento

INMETRO DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2010. Suas similaridades e diferenças podem ser visualizadas na tabela 3.

Tabela 3: Resumo de similaridades e diferenças entre as recomendações do INMETRO e ANVISA para a validação de metodologias analíticas

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
-----	Curva de calibração
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-----
Exatidão e tendência	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetitividade
Precisão Intermediária	Precisão Intermediária
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-----

Vale ressaltar que estes documentos sugerem uma linha a ser seguida e que, portanto estão abertos para a interpretação, deixando aos analistas adaptá-los de acordo com o método a ser utilizado.

Diante do fato que em algumas situações as definições dos parâmetros a serem empregados nas validações são diferentes e muitas vezes geram controvérsias, as indústrias farmacêuticas internacionais, com o objetivo de harmonizar as exigências feitas pelas agências reguladoras de vários países criam a *International Conference on Harmonization (ICH)*, na qual representantes de indústria, agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e em alguns casos, metodologias para a validação de métodos analíticos.

Assim como a ICH, algumas outras organizações também publicaram documentos harmonizando os parâmetros de validação e as suas definições, são eles a *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* e *International Standardization Organization (ISO)*.

Assim, órgãos como a ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental para assegurar a qualidade de medidas de um determinado laboratório, assim como a sua competência técnica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias para o controle de qualidade de componentes vacinais contra a meningite meningocócica sorogrupo B.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver metodologia para a avaliação da consistência de produção de antígenos vacinais a partir das seguintes técnicas:

- Eletroforese bidimensional;
- Espectrometria de massas;
- *Imunoblot*.

Avaliar o conteúdo de LOS em preparações vacinais por metodologias físico-químicas de dosagem de KDO.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS

A realização da parte experimental se deu nos seguintes laboratórios:

I – Laboratório de Produtos Biológicos – Departamento de Química – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-Fiocruz).

II – Laboratório de Microorganismos de Referência – Departamento de Microbiologia – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-Fiocruz).

III – Laboratório de Toxicologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

3.2 MATERIAL

3.2.1 Cepa de trabalho

Neisseria meningitidis sorogrupo B 4,7:P1 15,19 (44/89) – Laboratório de microrganismos de referência – INCQS-Fiocruz

3.2.2 Animais

Foram utilizados 12 camundongos *SwissWebster*, fêmeas, de 18 a 21 g, mantidos no Bioterio do INCQS.

3.2.3 Materiais de Referência

Albumina de soro bovino (BSA) - Sigma

Mistura de proteínas padrão de pesos moleculares conhecidos pré-corado *broad range* - Bio-Rad

LOS 96,5% padronizado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – BioManguinhos - Fiocruz

KDO – Sigma

3.2.4 Reagentes

Acetato de sódio (Merck), acetato de sódio (Merck), acetonitrila (Merck), ácido acético P.A. (Merck), ácido clorídrico concentrado (Merck), ácido trifluoroacético (Merck), acrilamida (Bio-Rad), azida de sódio (Merck), azul de bromofenol (Merck), bicarbonato de amônio (Merck), bis acrilamida (Sigma), butanol P.A. (Merck), carbonato de sódio (Merck), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merck), EDTA (Sigma), ferricianeto de potássio (Sigma), formaldeído (Merck), glicerol (Merck), glicina (Bio-Rad), glutaraldeído 25% (Merck), hidróxido de sódio (Merck), Meio de cultura Agar-chocolate (Merck), Meio de cultura Muller-Hilton (Merck), metanol P.A. (Merck), nitrato de prata (Merck), persulfato de amônio (Merck), Temed (Merck), tiosulfato de sódio (Merck), tripsina grau sequenciamento (Merck), tris hidroximetil amino metano (tris-base) (Merck), β -mercaptoetanol (Merck).

3.2.5 Kits comerciais e tira de gel para eletroforese bidimensional

DC Protein Assay Bio-Rad;

ReadyPrep 2-D Cleanup Kit Bio-Rad;

ReadyPrep 2-D Starter Kit Bio-Rad;

Tira de gel na faixa de pH 3 –10;

3.2.6 Equipamentos e acessórios

Speed-vac;

Bloco de digestão – Eppendorf;

Cuba eletroforética – Bio-Rad;

Cuba de eletrotransferência – Bio-Rad;

Protean IEF cell – Bio-Rad;

Fonte eletroforética de corrente contínua – Bio-Rad;

Centrífuga – Eppendorf;

Ultracentrífuga;

GS-800 calibrated Densitometer – Bio-Rad

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Dionex, modelo LC – 20, com auto-injetor AS-40, bomba GP-50, detector eletroquímico pulsado ED-40 e sistema de análise de dados PeakNet Cromilium;

Espectrofotômetro UV 1601 – Shimadzu;

Espectrômetro de massa AB SCIEX TOF/TOFTM 5800 (Applied Biosystems) com fonte de ionização foi do tipo MALDI;

Coluna analítica Carbo-Pac PA10 4 x 250 mm - Dionex;

Pré-coluna analítica Carbo-Pac PA10 4 x 50 mm PA10 – Dionex;

Pré-coluna Amino-Pac PA10 2 x 50 mm – Dionex;

Pré-coluna borato trap - Dionex;

Tubos de polipropileno com capacidade de 500 µL; 1000 µL e 100 µL;

Micropipetas de volume variado;

Tubos de ultracentrífuga

3.3 MÉTODOS

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados métodos que representam o estado da arte na análise de biomoléculas e que constam de recomendações gerais de compêndios oficiais, como a Farmacopéia Americana. Nesta referência a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas são recomendadas para a análise de produtos que contém proteínas para fins terapêuticos e a cromatografia de troca iônica de alta resolução acoplada a detecção amperométrica pulsada é recomendada para a análise de produtos que contém carboidratos.

3.3.1 Produção de OMV

A cepa de *N.meningitidis* B utilizada foi a 4,7:P1.15,19 (N44/89), gentilmente cedida pelo Dr. Ivano de Filippis do Laboratório de Microrganismos de referência do INCQS/Fiocruz. Esta cepa foi escolhida, por ser prevalente em nosso país e ser a cepa utilizada nas preparações candidatas a vacina nacional.

Uma ampola contendo a cepa N44/89, número de catálogo INCQS P2365, foi ressuspensa em caldo Mueller- Hinton (oxid) e o crescimento se deu a partir da semeadura em ágar chocolate, confeccionado com base ágar Mueller- Hinton (oxid) aquecido a 70⁰C, 10% de sangue desfibrinado e estéril, de cavalo. A incubação da placa de ágar chocolate foi feita a 37⁰C por um período de 12 horas, em jarra com atmosfera de 5% de CO₂(GOTSCHLICH et al., 1969).

Após o crescimento, as células foram removidas das placas de Agar chocolate com auxílio de alça de semeadura e ressuspensa em tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de solução salina estéril. Estes tubos foram

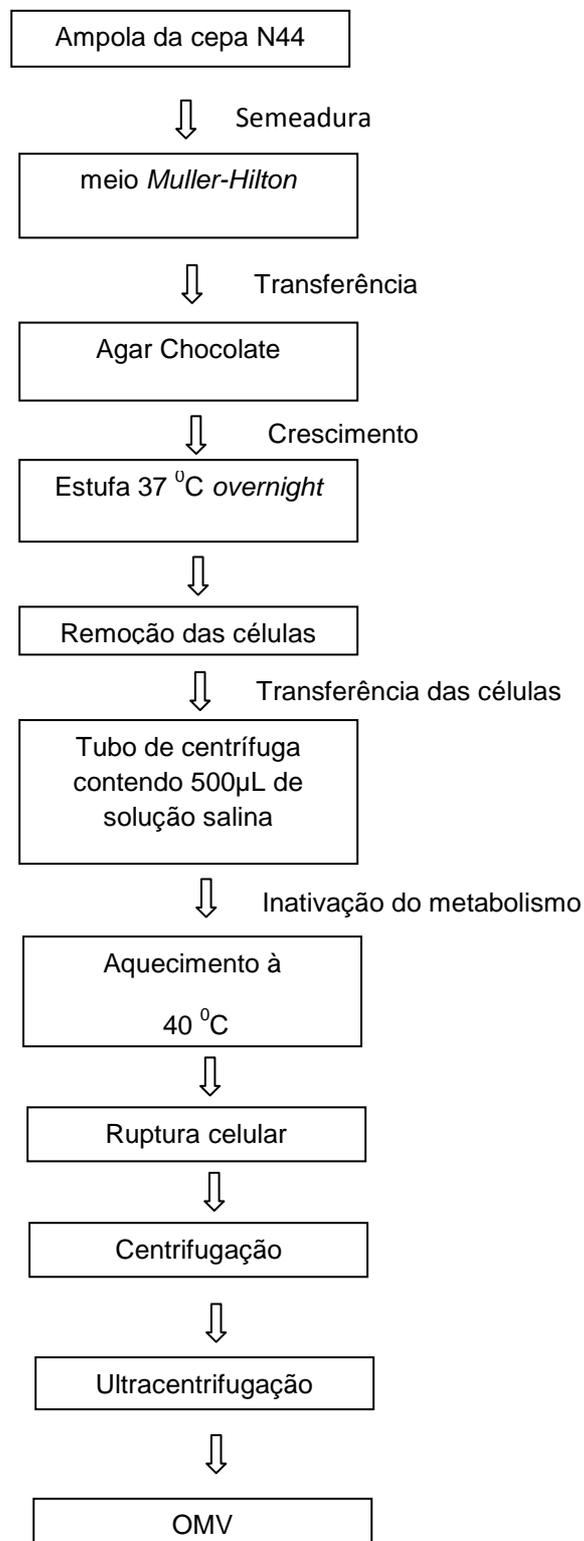
aquecidos a 56⁰C em bloco de aquecimento por 30-40 minutos, para promover a inativação do metabolismo celular.

Após a inativação, as células foram rompidas por choque mecânico através da passagem seqüencial da suspensão por agulhas com calibre de 19 e 27 mm.

Após a ruptura das células, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpms por 3 minutos e o sobrenadante foi removido para um novo tubo de microcentrífuga e centrifugado novamente a 11.000 RPMs por 5 minutos.

Após a segunda centrifugação, o sobrenadante, provavelmente contendo a OMV, foi transferido para um tubo de ultracentrífuga e ultracentrifugado a 150.000 x g por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o precipitado com 900 µL de água milli-Q e submeteu-se a ultracentrifugação novamente, a 150.000 x g por 30 minutos. Descartou-se o sobrenadante. O precipitado contendo a OMV foi ressuspenso em solução de azida de sódio 0,2 %. O esquema de produção de OMV está apresentado na figura 7.

Figura 7: Esquema de produção de OMV a partir de fermentação desenvolvida no Laboratório de Microrganismos de Referência – INCQS – Fiocruz.



Após a produção da OMV, as proteínas extraídas foram quantificadas pelo método DC Protein Assay Bio-Rad® e analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.3.2 Determinação do teor de proteínas totais – DC Protein Assay Bio-Rad®

Este método foi escolhido para a quantificação das proteínas, por se aplicar à quantificação de proteínas na presença de detergentes. Como na solubilização de proteínas de membrana são utilizados detergentes, para evitar que estes interferissem na quantificação este método foi utilizado. O princípio de método é similar ao descrito por Lowry (LOWRY et.al., 1951; PETERSON, 1979).

Para esta quantificação foi realizada uma curva de calibração, utilizando a albumina bovina como proteína padrão. Foi preparada uma solução de albumina bovina na concentração de 1000 µg/mL e a partir desta solução preparou-se 6 pontos da curva de calibração, pontos estes preparados em triplicata, nas seguintes concentrações: 10, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL e tomou-se uma alíquota de 100 µL para a reação colorimétrica.

As amostras foram preparadas ao final das etapas descritas na produção de OMV, onde o precipitado de OMV obtido foi ressuspenso com 100 µL de água Milli-Q e esta alíquota foi utilizada na reação colorimétrica de quantificação protéica.

Esta quantificação foi realizada durante todo o desenvolvimento do trabalho, a fim de acompanhar e controlar a produção de OMV.

3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)

Os antígenos de *N.meningitidis* utilizados em neste estudo foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições redutoras e não redutoras, em sistema descontínuo (LEAMMLI, et al., 1970).

Após a produção de OMV, a amostra foi ressuspensa com 100 µL de água milli-Q.

Para a análise protéica sob condições redutoras, as amostras foram preparadas adicionando-se uma alíquota de 10 µL da preparação a 10 µL de solução tampão de amostra com o agente redutor beta mercaptoetanol. Após a adição da solução tampão a preparação foi aquecida a 100 °C por 5 minutos

Para a análise protéica sob condições não redutoras, as amostras foram preparadas adicionando-se uma alíquota de 10 µL da preparação a 10 µL de solução tampão de amostra sem agente redutor. Após a adição da solução tampão a preparação foi aquecida a 100 °C por 5 minutos.

Para avaliar as preparações de OMV obtidas, foi feita a comparação do perfil protéico destas preparações com um lote piloto de vacina em desenvolvimento no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – BioManguinhos – Fiocruz.

Juntamente com as amostras foi aplicado um padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas (BioRad, pré-corado, *broad range*). Este padrão apresenta a seguinte composição protéica: miosina (200 kDa), β-galactosidase (115 kDa), albumina bovina (96 kDa), anidrase carbônica (37 kDa), Inibidor trípico de soja (29 kDa), lisosima (20 kDa) e aprotinina (7kDa).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado pelo método da prata (BLUM et al., 1987).

O gel obtido foi então analisado utilizando um densitômetro, GS-800 *calibrated Densitometer* – Bio-Rad, e os pesos moleculares das bandas foram determinados a partir da regressão linear entre o logaritmo do peso molecular e a migração relativa das proteínas padrão. Estes dados foram obtidos com o auxílio do *software quantity one* Bio-Rad.

3.3.4 Eletroforese Bidimensional

3.3.4.1 Otimização das condições eletroforéticas

Para a otimização das condições a serem utilizadas no mapa proteômico das preparações de OMV, foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 , onde duas variáveis foram avaliadas em 3 níveis e foi avaliada a superfície de resposta gerada a partir dos dados do planejamento. Neste planejamento foi utilizado o *Statistical Software* 6.0. O resumo dos fatores e os níveis empregados no planejamento estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Resumo de fatores e níveis empregados no planejamento

Fatores	Nível -1	Nível 0	Nível 1
Tempo de focalização	10.000 Vh	15.000 Vh	20.000 Vh
Tampão de solubilização	Solução tampão 1	Solução Tampão 2	Solução tampão 3

A composição das soluções tampão foi: (HENNINGSEN, et al., 2002).

Solução tampão 1: 8M de uréia, 2% CHAPS, 50 mM de DTT, 0,2 % de mistura de anfólitos 3-10;

Solução tampão 2: 7M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% de triton X, 1,8 mM de DTT, 0,5% de mistura de anfólitos 3-10;

Solução tampão 3: 7M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% de ABS-14, 65 mM de DTT, 1% de mistura de anfólitos 3-10.

Desta forma, as variáveis investigadas neste planejamento foram o tempo de focalização isoelétrica e a composição da solução tampão de solubilização da amostra. Estas variáveis foram selecionadas por serem críticas na obtenção de mapas proteômicos.

Como variável de resposta foi analisado o número de bandas (*spots*), juntamente com a resolução.

3.3.4.2 Preparo das amostras

A composição das amostras influencia muito a resolução da focalização isoelétrica (IEF). Os sais interferem no processo de focalização, assim como a presença de bases e ácidos de massa molecular pequena. Para eliminar esses efeitos as amostras foram submetidas a uma etapa prévia de purificação, utilizando o conjunto de reagentes para a preparação de amostras para eletroforese da Bio-rad, seguindo as instruções do fabricante no seu uso. Antes da purificação as amostras foram diluídas para que a massa total de proteínas presentes fosse de 100 µg. No final do tratamento o precipitado formado foi dissolvido em 125 µL de tampão de amostra.

3.3.4.3 Condições eletroforéticas

Aplicou-se 125 µL das amostras na cuba do sistema Protean IEF Cell. Colocou-se em seguida sobre cada linha do sistema tiras de 7 cm de comprimento, faixa de pH de 3,0 a 10,0. A focalização isoelétrica ocorreu nas seguintes condições: 1ª Parte: 250V por 20 min, com subida linear. 2ª Parte: 4000V por 2h, com subida linear. 3ª Parte 4000V até atingir um total de 20000V/hora, com subida rápida. Terminada a primeira dimensão, as tiras foram preparados para a segunda dimensão com o conjunto de reagentes starter, Bio-Rad, utilizados na eletroforese bi dimensional. A segunda dimensão foi feita com o gel à concentração de 12%. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado pelo método da prata (BLUM et al., 1987).

O gel obtido foi então analisado utilizando um densitômetro, GS-800 calibrated Densitometer – Bio-Rad, e os dados foram obtidos com o auxílio do software PD-Quest Bio-Rad.

Os valores de massa molecular e o ponto isoelétrico de cada banda eletroforética foram determinados utilizando funções específicas do programa.

Os géis foram conservados em ácido acético 10%, temperatura de 2-8°C, para posterior excisão das bandas eletroforéticas e tratamento com tripsina.

3.3.4.4 Seleção e descoloração das bandas (*spots*) para a hidrólise trípica

As bandas eletroforéticas de interesse foram cortadas do gel e adicionadas em tubos de polipropileno de 0,5 mL desprezando-se qualquer excesso de acrilamida.

Em seguida foi realizada a descoloração, adicionando-se ao tubo de polipropileno um volume suficiente para cobrir o gel de uma solução 1:1v/v de ferricianeto de potássio 30 mM e tiosulfato de sódio 100 mM. O gel foi incubado nesta solução por 15 minutos. Após este tempo esta solução foi removida e o gel foi lavado com água por 3 vezes, por 5 minutos. Após a remoção da água, adicionou-se ao tubo de polipropileno um volume suficiente para cobrir o gel de uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM. O gel foi incubado nesta solução por 10 minutos. Após este tempo esta solução foi removida e o gel foi lavado com acetonitrila 100% por 10 minutos. Após este tempo, a acetonitrila foi removida e o gel foi seco em concentrador do tipo speed-vac por 15 minutos (GHARAHDAHGI, et al., 1999).

3.3.4.5 Hidrólise trípica das bandas (*spots*)

Após o descoloramento das bandas eletroforéticas selecionadas no gel, estas foram submetidos à hidrólise utilizando tripsina grau de pureza adequado ao sequenciamento (SHEVCHENKO et al., 1996).

A tripsina foi preparada de acordo com as recomendações do fornecedor. A um frasco contendo 100 µg de enzima foi adicionado 100 µL de solução de ácido acético 50 mM, para que a concentração final de tripsina seja 1 µg/µL. A partir desta solução de tripsina foi feita uma diluição para que a

concentração final de tripsina fosse 0,02 µg/µL. Todas as soluções de tripsina, assim como as diluições foram realizadas em banho de gelo.

Para a hidrólise triptica, foi adicionado ao gel previamente descorado 10 µL de solução de tripsina 0,02 µg/µL. Este sistema foi mantido em banho de gelo por 10 minutos (para que a tripsina penetre no gel, sem que inicie a digestão). Findos os 10 minutos, o excesso de tripsina foi removido e adicionou-se 20 µL de solução tampão bicarbonato de amônio 50 mM. O gel foi mantido nesta solução por um período de 12 horas em bloco de digestão a 37 °C.

Após o período de incubação, a solução tampão de bicarbonato de amônio 50 mM foi removida e transferida para outro tubo de polipropileno. Para a extração dos peptídeos do gel adicionou-se 60 µL de solução de TFA 5% em acetonitrila 50% e manteve-se o sistema sob agitação constante por 30 minutos. Após este tempo, removeu-se esta solução e adicionou-se ao tubo de polipropileno anterior. Esta extração foi repetida mais uma vez e juntaram-se todos os extratos no mesmo tubo.

Os extratos foram concentrados em concentrador de amostras do tipo *speed-vac* por aproximadamente 30 minutos. As amostras foram guardadas em *freezer* a - 20°C para a posterior análise por espectrometria de massas.

Um pedaço de acrilamida de cada gel foi usado como controle negativo do experimento.

3.3.4.6 Espectrometria de massas

Para a identificação das bandas eletroforéticas, foi utilizada a técnica do *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) e a espectrometria de massas seqüencial.

Os peptídeos foram analisados por espectrometria de massa, usando espectrômetro de massa AB SCIEX TOF/TOF TM 5800 (Applied Biosystems). A fonte de ionização foi do tipo MALDI.

As amostras de peptídeos foram ressuspendidas em 1,5 µL de solução de acetonitrila 50% e TFA 0,1% e em seguida centrifugadas. Na placa modelo

28571, foram aplicados 0,3 µL de amostra e 0,3 µL da matriz ácido α-ciano-p-hidroxicinâmico (ACHC).

Para a aquisição dos espectros o espectrômetro foi operado no modo refletido, com detecção para íons positivos. A calibração do equipamento foi feita com uma mistura de peptídeos padrões fornecido pelo fabricante do equipamento.

3.3.4.7 - Identificação das bandas eletroforéticas

Para a identificação da proteína, os valores dos picos, referentes as diferentes massas moleculares, formados no espectro de massas são comparados de peptídeos teoricamente resultantes da hidrólise por tripsina das seqüências disponíveis em bancos de dados. Essa comparação é feita em páginas da internet que disponibilizam gratuitamente os programas de busca.

O resultado da comparação é expresso em uma probabilidade de identificação da proteína. Os fatores que podem ajudar na identificação são o ponto isoelétrico (pI), o peso molecular (PM) e a resolução dos espectros obtidos. Fatores que dificultam a identificação são modificações na proteínas após a etapa de tradução do mRNA, tais como a glicosilação, fosforilação e acetilação. Alguns artefatos formados durante a eletroforese, como a metilação dos resíduos de aspartato e glutamato, carbamilação dos resíduos de lisina, oxidação dos resíduos de triptofano e hidrólise por proteases presentes na amostram também dificultam a identificação da proteína (JUNGBHLUT, 2005).

Desta forma, fez-se a pesquisa de identificação das proteínas por intermédio do programa Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

Nas buscas foram consideradas as massas monoisotópicas de fragmentos obtidos dos peptídeos mais abundantes. Considerou-se também a massa proveniente de modificações em função da adição de iodoacetamida as cisteínas.

3.3.5 Imunização dos camundongos com a OMV produzida no laboratório para a produção de anticorpo policlonal

Para a preparação do anti-soro, foram utilizados 2 grupos de 6 camundongos *SwissWebster*, fêmeas, de 18 a 21 g, mantidos no Biotério do INCQS.

O esquema de imunização dos animais é mostrado na tabela 5. A preparação de OMV foi solubilizada em PBS, pH 6,0 e emulsionado em seringa com os adjuvantes imediatamente antes da aplicação. Foi utilizado o adjuvante completo de Freund para a primeira imunização e o adjuvante incompleto de Freund para as demais imunizações, para evitar o estresse do animal.

O imunógeno foi preparado com partes iguais (1:1) de OMV e adjuvante. A concentração de proteínas totais, determinada por Lowry et al.,1951, na preparação de OMV foi 340 µg/mL. A via de inoculação foi intramuscular e foi injetado 100 µL de imunógeno.

O sangue dos animais foi coletado pelo plexo orbital. Foi coletado o soro pré-imune, para ser utilizado como branco no ensaio de soro conversão e os demais soros de acordo com o esquema apresentado na tabela 5. Após a preparação do anticorpo e sangria total, o plasma foi separado por coagulação e guardado a -20°C antes do uso.

Tabela 5: Esquema de imunização dos camundongos com OMV

Dia	Número de camundongos	Concentração de Imunógeno	Volume De Imunógeno	Adjuvante
zero	12	170µg/mL	100 µL	Freund completo
21	12	170µg/mL	100 µL	Freund incompleto
42	12	170µg/mL	100 µL	Freund incompleto
63		zero	Zero	Zero - Sangria pelo plexo orbital e eutanásia dos animais

3.3.6 Determinação da soro conversão em camundongos

Para a avaliação da soro conversão dos anticorpos policlonais anti-OMV, as amostras de OMV foram submetidas à eletroforese do tipo SDS-PAGE em condições redutoras. Terminada a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF, no sistema de transferência submersa Mini Trans-Blot® Cell, durante 60 minutos com corrente constante de 150 mA. O esquema de diluições empregado na determinação da soro conversão está apresentado na tabela 6. Após a eletrotransferência, a membrana foi tratada com solução tampão de bloqueio (1 % de BSA em PBS) por 1h, lavada duas vezes, por 5 minutos com solução tampão tris salino (TBS) e uma vez, por 5 minutos com solução tampão tris salino contendo tween 20 (TTBS). Após as lavagens, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo anti-OMV de camundongo, preparado em tampão de anticorpos. Na próxima etapa a membrana foi lavada três vezes, por 10 minutos com TTBS e foi adicionado o anticorpo anti-camundongo conjugado a fosfatase alcalina e incubado por 1 hora. Após esta incubação, adicionou-se o substrato da fosfatase alcalina BCIP/NBT. O desenvolvimento de cor foi acompanhado visualmente e a reação foi interrompida pela lavagem com água. As membranas foram então secas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a secagem as membranas obtidas foram digitalizadas no densitômetro GS 800 com o auxílio do programa Quantity One.

Tabela 6: Esquema de diluição do soro para revelação da membrana

Soro	Diluição v/v
A	1:50
B	1:100
C	1:200
D	1:400

3.3.7 Imunoblot

As amostras foram submetidas à eletroforese bidimensional, de acordo com as condições apresentadas no item 3.3.4.3.

Terminada a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF, no sistema de transferência submersa Mini Trans-Blot® Cell, durante 60 minutos com corrente constante de 150 mA. Após a eletrotransferência, a membrana foi tratada com solução tampão de bloqueio (1 % de BSA em PBS) por 1h, lavada duas vezes, por 5 minutos com TBS e uma vez, por 5 minutos com TTBS. Após as lavagens, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo anti-OMV de camundongo, preparado em solução tampão de anticorpos, na diluição de 1:200 v/v. Na próxima etapa a membrana foi lavada três vezes, por 10 minutos com TTBS e foi adicionado o anticorpo anti-camundongo conjugado a fosfatase alcalina e incubado por 1 hora. Após esta incubação, adicionou-se o substrato da fosfatase alcalina BCIP/NBT. O desenvolvimento de cor foi acompanhado visualmente e a reação foi interrompida pela lavagem com água. As membranas foram então secas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a secagem as membranas obtidas foram digitalizadas no densitômetro GS 800 com o auxílio do programa Quantity One.

3.3.8 Determinação do teor de LOS

A determinação do teor de LOS foi feita a partir da quantificação de KDO por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada. As etapas da determinação foram:

3.3.8.1 Preparo da amostra

As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com TFA 0,5N 100 °C por 3 horas. Após a hidrólise, a amostra foi seca em *speed-vac* e ressuspensa em 500 µL com água Milli-Q

3.3.8.2 Condições cromatográficas

Os ensaios de cromatografia de troca aniônica foram realizados de acordo com CHALABAEV et al., 2010.

Foram utilizadas as colunas analíticas Carbo-Pac PA10 4 x 250 mm, pré-coluna analítica Carbo-Pac PA10 4 x 50 mm PA10, pré-coluna Amino-Pac PA10 2 x 50 mm e pré-coluna borato trap. Foi empregado o sistema de eluição isocrático com a mistura dos eluentes NaOH 100 mM e Acetato de sódio 100 mM realizada na bomba do equipamento.

A detecção foi amperométrica pulsada, utilizado um detector eletroquímico, aplicando-se os potenciais apresentados abaixo:

Tempo (segundos)	Potential (V)	Integração
0.00	+ 0.05	
0.20	+ 0.05	Início
0.40	+ 0.05	Fim
0.41	+ 0.75	
0.60	+ 0.75	
0.61	- 0.15	
1.00	- 0.15	

O fluxo de trabalho foi 1 mL /minuto, o volume de injeção foi 25 µL e o tempo de análise foi de 20 minutos.

3.3.9 - Validação da metodologia de quantificação de KDO por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada.

A validação da metodologia de quantificação de KDO foi feita de acordo com as recomendações do INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: Linearidade, seletividade/especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, avaliada a partir da repetitividade e precisão intermediária e exatidão. Além destes parâmetros, em todas as medidas foi realizado o cálculo para a investigação da presença de valores aberrantes.

3.3.9.1 Linearidade

3.3.9.1.1 Preparo da curva de calibração para avaliação da Linearidade do método

Para a avaliação de linearidade, trabalhou-se com LOS padrão, com pureza de 96,5% e purificado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – BioManguinhos - Fiocruz. Este tipo de substância de referência se enquadra como matriz de referência, que deve ser usada quando não é possível fazer a utilização de um padrão comercial rastreável ou um padrão internacional (EURACHEM 2000).

A Linearidade do método foi avaliada através da análise em triplicata de 5 (cinco) concentrações diferentes do padrão de LOS. Para esta avaliação foram feitas 3 (três) curvas de calibração em 3 (três) dias diferentes, com o objetivo de verificar possíveis diferenças de comportamento do modelo linear, quando se varia o dia da análise.

3.3.9.1.2 Preparo do padrão de LOS

O preparo geral da solução padrão de LOS utilizada na avaliação de linearidade do método, que foi feita em 3 dias diferentes, se deu a partir da pesagem de cerca de 10 mg de padrão e adição de 2500 μ L de TFA 0,5N. Esta preparação foi submetida à hidrólise por 3 horas em banho-maria a 100 °C. Após a hidrólise, a preparação foi seca em concentrador de amostra do tipo speed-vac e ressuspensa volumetricamente em volume final de 10,00 mL com água Milli-Q. Esta solução padrão foi mantida congelada até o uso e foi utilizada como solução estoque para o preparo das curvas de calibração. As soluções utilizadas a cada dia de verificação estão descritas nos itens a seguir.

3.3.9.1.3 Avaliação da linearidade Dia 1

Pesou-se 10,5 mg de LOS e a solução padrão apresentou concentração de 1050 µg/mL. Desta solução padrão foram feitas às diluições para o preparo da curva de calibração apresentada na tabela 7:

Tabela 7: Resumo do procedimento de preparo da curva de calibração

Volume (µL) da solução padrão de LOS 1050 µg/mL	Volume final com água milli-Q (µL)	Concentração LOS (µg/mL)
10	2000	5,25
20	2000	10,50
100	2000	52,50
200	2000	105,00
300	2000	157,50

3.3.9.1.4 Avaliação da linearidade Dia 2 e 3

Pesou-se 7,9 mg de LOS e a solução padrão apresentou concentração de 790 µg/mL. Desta solução padrão foram feitas às diluições para o preparo da curva de calibração apresentada na tabela 8. Nos dias 2 e 3 foram utilizadas a mesma solução mãe, para o preparo da curva de calibração.

Tabela 8: Resumo do procedimento de preparo da curva de calibração

Volume (μL) da solução padrão de LOS 790 $\mu\text{g/mL}$	Volume final com água milli-Q (μL)	Concentração LOS ($\mu\text{g/mL}$)
13	2000	5,14
25	2000	9,88
126	2000	49,77
253	2000	99,94
405	2000	159,98

3.3.9.1.5 Seletividade

Para o estudo de seletividade, foi preparada uma curva de calibração com o LOS padrão 96,5% e foram feitas adições padrão com padrão de KDO fornecido pela Sigma, com o objetivo de verificar o aumento do pico correspondente ao KDO nos padrões de LOS. Dessa maneira, foi possível avaliar o efeito de matriz. A observação do aumento do pico indica que o método é seletivo para a determinação de KDO na matriz de trabalho.

Neste experimento preparou-se uma solução de KDO Sigma, contendo 10,8 $\mu\text{g/mL}$ e nesta solução foram feitas as adições de padrões de LOS em diferentes concentrações.

Para o preparo da curva de calibração utilizada neste teste, preparou-se uma solução mãe da seguinte forma: Pesou-se 6,2 mg do padrão de LOS 96,5%, adicionou-se 2500 μL de TFA 0,5N, e colocou-se em banho-maria por 3 horas à 100°C. A solução obtida foi seca em concentrador de amostra do tipo *speed-vac* e após a secagem foi adicionado 10mL de água Milli-Q, de modo que a concentração final foi de 620 $\mu\text{g/mL}$.

A partir desta solução mãe foi retirada uma alíquota de 13 μL e avolumou-se para 2000 μL com água Milli-Q, obtendo-se assim uma concentração de 4,03 $\mu\text{g/mL}$, correspondente ao ponto 1 da curva de calibração. Da mesma forma, foi retirada uma alíquota de 126 μL da solução mãe e avolumou-se para 2000 μL com água Milli-Q, obtendo uma solução com

concentração de 39,06µg/mL correspondente ao ponto 3 da curva de calibração. E para o ponto 4 da curva de calibração foi retirada uma 405µL da solução mãe e avolumou-se para 2000µL com água Milli-Q obtendo uma concentração de 125,55µg/mL.

O procedimento de preparo para as injeções está apresentado na tabela 9.

Tabela 9: Resumo do procedimento de preparo das amostras destinadas a avaliação de seletividade

Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3
200 µL do padrão Sigma + 200 µL do p1	200 µL do padrão Sigma + 200 µL do p3	200 µL do padrão Sigma + 200 µL do p4

3.3.9.1.6 Precisão

Neste trabalho, foram avaliados 2 níveis de precisão a saber: Repetitividade e Precisão intermediária

3.3.9.1.7 Repetitividade

O estudo de repetitividade foi realizado preparando-se 1 hidrólise da amostra, analisada em quintuplicata. A repetitividade foi expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas (desvio padrão relativo). Estas determinações foram realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista.

3.3.9.1.8 Precisão intermediária

Para os estudos de precisão intermediária foi preparada uma amostra e esta foi analisada em triplicata, em dias diferentes. Foram utilizados dias aleatórios para a medida de erro aleatório.

3.3.9.1.9 Exatidão

Para a avaliação da exatidão foi feita adição padrão na matriz e verificou-se a recuperação. O resumo do procedimento de preparo das amostras para a avaliação da exatidão está apresentado na tabela 10.

Tabela 10: Resumo do procedimento de preparo das amostras para a avaliação da exatidão

Preparação 1	Preparação 2
200 µL da amostra (157,059 µg/mL)	200 µL da amostra (157,059 µg/mL)
+	+
200 µL do p2 (7,75 µg/mL)	200 µL do p4 (79,43 µg/mL)

A exatidão foi calculada a partir dos resultados obtidos, como o percentual de resposta dado através do ensaio.

3.3.9.1.10 Limite de detecção e limite de quantificação

Para o estudo do limite de detecção do método foram utilizadas duas abordagens, a saber:

- 1) Diluições do padrão de KDO com concentrações conhecidas.

Utilizando os padrões de KDO, foram realizadas 7 diluições a partir do primeiro ponto da curva, que apresentava concentração de 5,135 µg/mL, de cada concentração foi feita 1 injeção e as concentrações de trabalho foram: 2,99 µg/mL, 1,99µg/mL, 1,00µg/mL, 0,50µg/mL, 0,25µg/mL, 0,10µg/mL e 0,06µg/mL.

- 2) Análise dos valores de coeficiente angular da reta obtida para a curva de calibração e do desvio padrão do intercepto em Y das linhas de regressão obtidas no estudo de linearidade.

3.3.10 Cálculos estatísticos empregados na validação

3.3.10.1 Estudos de linearidade

Em cada conjunto de resultados obtidos para cada ponto da curva (áreas) foi aplicado o teste de Grubbs, para verificar a presença ou não de valores aberrantes.

Para a determinação de valores aberrantes foi realizado o teste de Grubbs com nível de significância (p) de 0,05.

$$G = \frac{(y_{ij} - y_i)}{S_{ij}}$$

Onde:

y_{ij} = valor suspeito de ser aberrante

y_i = média dos valores obtidos para uma determinada concentração i

S_{ij} = Desvio padrão dos valores obtidos

O valor de G deve ser inferior ao valor de G tabelado em função do número de replicatas (n) considerar y_{ij} aberrante caso isto seja verificado.

Para $n=3$, o valor de G é 1,155.

3.3.10.2 Avaliação da homocedasticidade do método

Antes de avaliar a linearidade do método em questão foi necessário verificar se o modelo linear se aplicava às características do método. Para isto, os resultados obtidos para as triplicatas dos pontos da curva de calibração foram submetidos ao teste estatístico, chamado de teste de Cochran.

O teste de Cochran avalia o critério de homocedasticidade, que é observância de que os dados regredidos encontram-se mais homoganeamente e menos dispersos (mais concentrados) em torno da reta de regressão do modelo.

Caso o critério de homocedasticidade seja cumprido, a curva de calibração será calculada pelo método dos mínimos quadrados. Caso contrário, a curva será calculada pelo método dos mínimos quadrados ponderados pelo intervalo da concentração ($1/x$)

A homocedasticidade do método foi verificada através do teste de Cochran.

$$C_{cal} = \text{maior } S^2 / \sum S^2$$

$C_{cal} > C_{tab}$ Método heterocedástico

$C_{cal} < C_{tab}$ Método homocedástico

O valor de C é calculado para um número certo de comparações (K) e um número certo de replicatas (n). No caso dos experimentos em questão, n=3 e K=5. Um resumo de valores teóricos de **Cochran** é apresentado na tabela 11.

Tabela 11: Tabela de valores de **Cochran**.

K	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6
3	0,967	0,871	0,798	0,746	0,707
4	0,906	0,768	0,684	0,629	0,590
5	0,841	0,684	0,598	0,544	0,506

Onde: maior S^2 = variância máxima

$\sum S^2$ = somatório das variâncias

k = número de variâncias a serem comparadas, k = 5

n = número de replicatas em cada variância, n = 3

C cal = Valor calculado para o C de Cochram

C tab = Valor tabelado para o C de Cochram

3.3.10.3 Precisão

Neste trabalho, foram avaliados 2 níveis de precisão a saber:

Repetitividade

Precisão intermediária

A repetitividade foi expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas (desvio padrão relativo). Estas determinações foram realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista.

O desvio padrão relativo foi então determinado da seguinte maneira:

$$SR \% = \frac{S \times 100}{x}$$

Onde:

SR% - Desvio padrão relativo

S = Desvio padrão

X – Média dos resultados

A determinação da precisão intermediária serve como uma medida do erro aleatório e é expressa através da dispersão obtida em uma série de medidas repetidas, realizadas variando-se ou o dia da medida, ou o analista ou o equipamento.

Para a avaliação dos resultados obtidos, primeiramente aplicou-se o teste de Cochran, para verificar se os resultados são homo ou heterocedástico. Esta verificação se faz necessária, pois irá orientar o cálculo do desvio padrão. Se os resultados forem homocedásticos, será calculado o desvio padrão agrupado. Caso contrário, o desvio padrão calculado será o simples.

3.3.10.4 Teste de Cochran para a avaliação da precisão intermediária

O teste de Cochran foi realizado da seguinte maneira:

$$C_{cal} = \text{maior } S^2 / \sum S^2$$

$C_{cal} > C_{tab}$ Método heterocedástico

$C_{cal} < C_{tab}$ Método homocedástico

O valor de C é calculado para um número certo de comparações (K) e um número certo de replicatas (n). Nos experimentos executados, n=3 e K=3, C= 0,871.

Onde:

maior S^2 = variância máxima

$\sum S^2$ = somatório das variâncias

k = número de variâncias a serem comparadas

n = número de replicatas em cada variância

C_{cal} = Valor calculado para o C de Cochran

C_{tab} = Valor tabelado para o C de Cochran

Desvio padrão agrupado:

$$S^2_{ag} = (n_1-1) S_1^2 = (n_2-1) S_2^2 = (n_3-1) S_3^2 / (n_1 + n_2 + n_3) - 3$$

Onde:

n_1, n_2, n_3 = número de determinações para cada concentração.

S_1^2, S_2^2, S_3^2 = Variância para cada concentração.

Para a avaliação final dos resultados foi utilizado o desvio padrão relativo, que também pode ser chamado de coeficiente de variação ou amplitude. Quanto menor for a amplitude, melhores estão os resultados obtidos para precisão intermediária. É considerado satisfatório, valores de amplitude de até 5%.

A amplitude ou desvio padrão relativo foi determinada da seguinte maneira:

$$SR\% = \frac{S \times 100}{\bar{x}}$$

Onde:

SR% = desvio padrão relativo

S = desvio padrão

\bar{x} = média das leituras

3.3.10.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e quantificação do método foi determinado através da seguinte fórmula matemática:

$$LD = \frac{(3,3 \times S)}{\alpha}$$

Onde:

LD = Limite de detecção

S = Desvio padrão médio obtido para as 3 curvas de calibração do estudo de linearidade

α = coeficiente angular médio obtido para as 3 curvas de calibração do estudo de linearidade.

$$LQ = \frac{(10 \times S)}{\alpha}$$

Onde LQ = limite de quantificação

S = Desvio padrão médio obtido para as 3 curvas de calibração do estudo de linearidade

α = coeficiente angular médio obtido para as 3 curvas de calibração do estudo de linearidade

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PRODUÇÃO DE OMV

Após o crescimento da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B e a obtenção da massa de microrganismos, a preparação foi submetida a marcha de extração para a obtenção de proteínas da membrana externa, na forma de OMV. Para o acompanhamento da produção de OMV, foi realizada a quantificação do teor de proteínas totais nas preparações. A quantificação do teor de proteínas pode ser utilizada como parâmetro de acompanhamento do desenvolvimento e das condições de cultivo empregadas, pois uma vez que estas condições estejam controladas adequadamente, espera-se encontrar variações pequenas nas quantidades de proteínas obtidas (TSOLAKOS et al., 2010).

Para esta quantificação foi utilizado o *DC Protein Assay* Bio-Rad®. Este método de quantificação apresenta fundamento similar ao fundamento de quantificação empregado no método de Lowry, com a vantagem de favorecer a quantificação de proteínas hidrofóbicas (LOWRY et.al., 1951; PETERSON, 1979). A utilização do *DC Protein Assay* Bio-Rad® na quantificação de proteínas, se deu devido ao fato de as proteínas de membrana serem os maiores constituintes protéicos da nossa amostra e estas proteínas apresentam elevado caráter hidrofóbico.

Os resultados obtidos na quantificação proteica são apresentados na tabela 12 onde é possível observar que os teores encontrados foram na faixa de 150 a 210 µg/mL. As variações encontradas nos teores de proteínas podem se dever ao fato de que este teor está associado ao crescimento bacteriano.

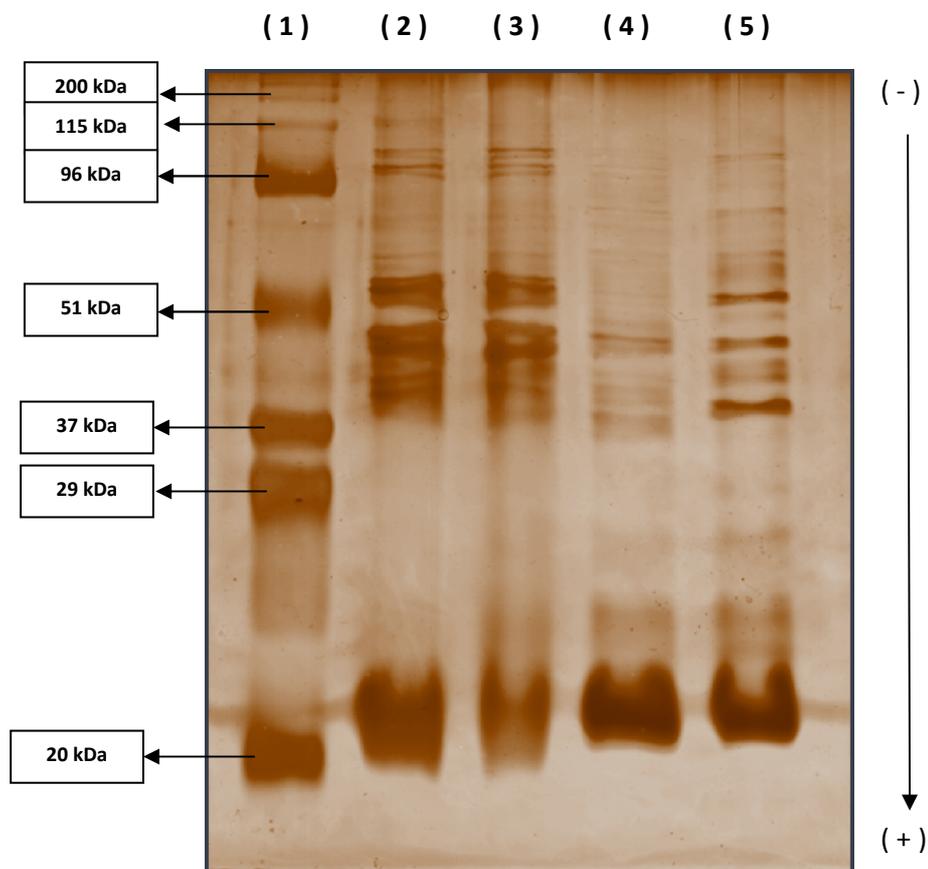
Tabela 12: Resumo do teor de proteína encontrado para as fermentações desenvolvidas.

Fermentação	Teor de proteínas (µg/mL)
1	170 µg/mL
2	150 µg/mL
3	210 µg/mL
4	180 µg/mL

Como é sabido a otimização das condições de cultivo em processos fermentativos está diretamente relacionada com as quantidades de antígenos obtidas e com o perfil destes antígenos (TSOLAKOS et al., 2010). Desta forma, para avaliar as condições empregadas em nosso trabalho, a cada produção de OMV desenvolvida, procedemos além da quantificação do teor de proteínas totais, a avaliação do perfil protéico por SDS-PAGE.

Após a produção da OMV, as proteínas foram extraídas da membrana externa e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo os resultados obtidos mostrados na Figura 8.

Figura 8: Eletroforese desnaturante descontínua em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Foram aplicados 1 μ L de mistura de proteínas padrão e 10 μ L de amostra. A coloração foi feita pelo método da prata. (1) – Padrão, (2) – Preparação vacinal em condições nativas (3) Preparação vacinal em condições desnaturantes, (4) OMV em condições nativas, (5) – OMV em condições desnaturantes.



Neste experimento foram utilizados dois tipos diferentes de solução tampão para a solubilização de amostra: uma delas contendo SDS e β -mercaptoetanol e outra somente com SDS. A utilização destas duas soluções tampão teve como objetivo obter informações a respeito de uma particularidade estrutural dos antígenos protéicos encontrados na preparação, investigando assim a possível presença de subunidades proteicas mantidas por pontes dissulfeto. Esse experimento serviu como meio de acompanhamento da produção de antígenos proteicos durante o processo fermentativo, onde foi feita a comparação entre os perfis proteicos eletroforéticos de uma preparação vacinal contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B e a preparação recentemente obtida a partir da fermentação descrita nesta dissertação.

Tabela 13: Comparação das massas moleculares das bandas obtidas a partir do SDS-PAGE da preparação vacinal piloto em condições nativas (VN) e desnaturantes (VD) e da OMV obtida no INCQS em condições nativas (OMP N) e desnaturantes (OMP D).

VN (kDa)	VD (kDa)	OMP N (kDa)	OMP D (kDa)
123,4	*	*	*
106,1	106,5	105,2	104,7
101,0	101,5	100,8	101,3
99,2	98,5	97,5	96
80,9	81,6	83,9	83,6
76,8	77,1	76,5	*
66,9	67,2	67,4	67,1
62,2	59,9	*	62,4
59,5	57,6	*	*
56,9	*	55,3	*
53,5	53,3	49,0	54,8
48,2	48,2	47,2	46,8
46,2	45,7	46,1	*
42,5	*	42,7	43,7
40,9	41,3	41,1	42,6
*	*	39,9	39,3
21,0	21,3	21,2	21,0

* – Proteína não identificada

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que com relação ao perfil protéico, a preparação obtida a partir da fermentação, apresentou por SDS-PAGE resultado muito similar com o encontrado para a preparação vacinal que serviu de referência, produzida pelo Instituto de Imunobiológicos, BioManguinhos.

Com relação aos antígenos encontrados neste experimento, algumas inferências podem ser feitas. Na tabela 13, é apresentado o resumo dos resultados relativos as massas moleculares das bandas obtidas no gel apresentado na figura 8.

Os dados relativos a massa molecular das proteínas apresentados na tabela 13 quando comparados com os dados encontrados na literatura, é possível verificar que a ação do agente redutor β -mercaptoetanol não promoveu modificações significativas no perfil protéico das preparações analisadas. Tal observação sugere que os antígenos protéicos encontrados não se associam através de pontes dissulfeto.

Comparando os resultados obtidos para a OMV proveniente da fermentação com os resultados originários da preparação vacinal destacam-se as bandas com massa molecular de 100 – 110 kDa. Estas bandas estão presentes nas duas preparações e acredita-se que se devam a associações diméricas das PorA e/ou PorB (VERMONT et al., 2004).

As bandas com massa molecular na faixa de 80 – 99 kDa, de acordo com dados da literatura pode se dever ao antígeno protéico omp85 (MCNEIL et al., 2009). As bandas com peso molecular na faixa de 40 – 48 kDa podem se dever aos antígenos PorA, PorB e NadA (VERMONT et al., 2004; JACOBSSON et al., 2009).

A banda intensa, com peso molecular na faixa de 21 kDa, pode corresponder aos seguintes antígenos RmpM, NspA e fHBP (VIPOND et al., 2006).

Alguns dos antígenos citados anteriormente já fazem parte dos estudos de desenvolvimento de uma vacina universal e a constatação da sua presença nas preparações convencionais aponta pontos importantes nas estratégias de produção de vacinas (SERRUTO et al., 2004).

Dentre os antígenos citados anteriormente pode-se destacar o fHBP, que é um antígeno expresso em quantidades pequenas em condições naturais.

Essa proteína é um antígeno muito conservado, o que o torna um importante candidato a produção de uma vacina universal, utilizando a tecnologia de DNA recombinante (OLIVER et al., 2007; SCARSELLI et al., 2009).

Para confirmar essas inferências sobre os antígenos presentes nas preparações foi necessária a identificação das proteínas, pelo uso da eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

4.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A eletroforese bidimensional é uma ferramenta fundamental na área da proteômica, pois pode ser usada para visualizar um grande número de proteínas e/ou polipeptídeos simultaneamente e suas diferentes isoformas (HAYNES et al., 2000; LOW et al., 2002).

No entanto, a eletroforese bidimensional apresenta ainda algumas limitações como reprodutibilidade e boa resolução de proteínas pouco abundantes, hidrofóbicas e de alto peso molecular (SANTONI et al., 1999; RABILLOUD et al., 1997; SCHUCK, et al., 2003; HEBERT, 1999). Dessa forma, o processo de solubilização de proteínas é um passo muito importante na eletroforese bidimensional.

Além disso, o tempo de focalização também constitui uma variável a ser considerada na otimização das condições experimentais para o desenvolvimento da eletroforese bidimensional, já que está diretamente relacionado com a resolução das bandas obtidas. Sendo assim, para encontrar a melhor condição experimental para a avaliação do mapa proteômico das preparações de OMV foi realizado um planejamento fatorial.

O planejamento fatorial é uma técnica bastante utilizada tanto em pesquisa de base, quanto em desenvolvimento tecnológico. Esse planejamento é classificado como um método simultâneo, onde as variáveis de interesse, que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Neste caso, as variáveis estudadas foram a solução tampão de solubilização das amostras e o tempo de focalização (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Os planejamentos fatoriais apresentam grande utilidade na avaliação da influência de uma ou mais variáveis de resposta presentes no desenvolvimento ou avaliação de um processo (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Neste caso, a variável de resposta empregada foi o número de bandas eletroforéticas obtidas com resolução satisfatória, a partir da eletroforese bidimensional.

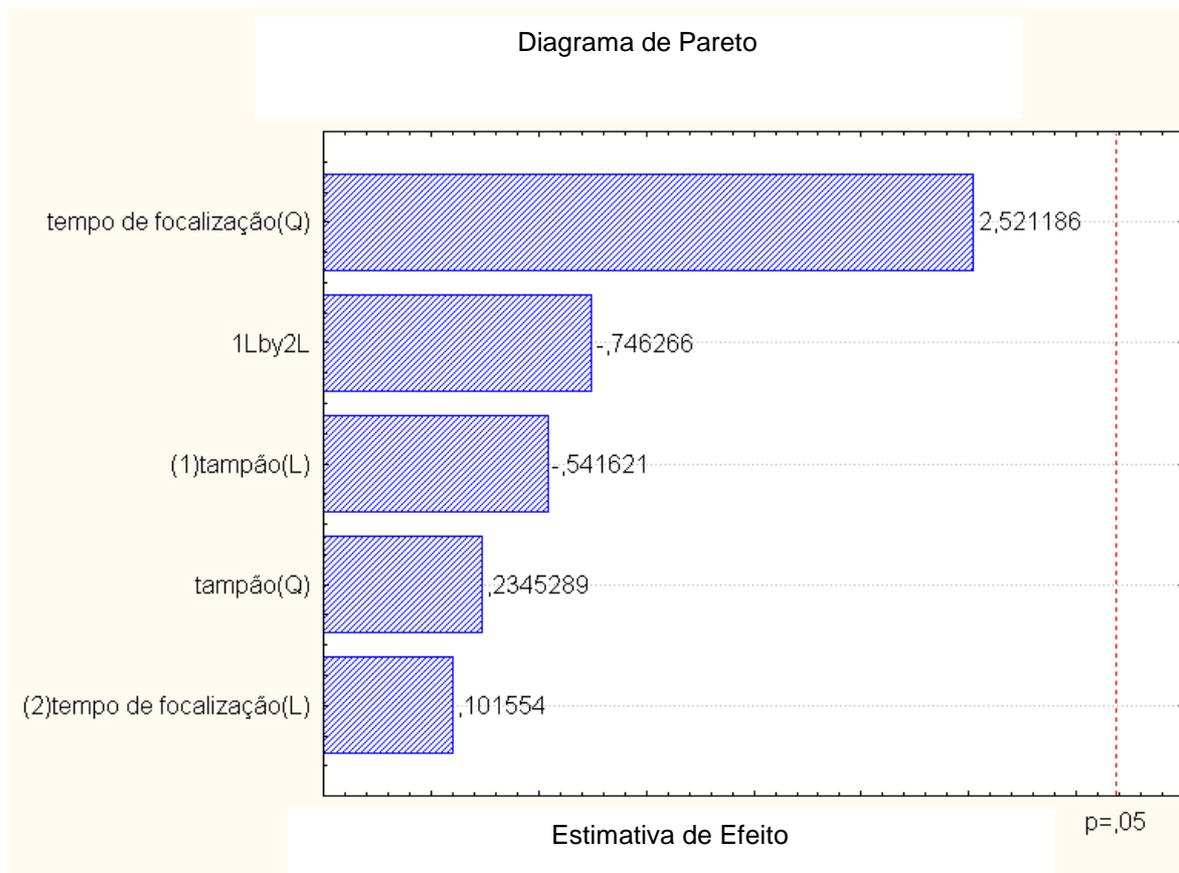
De acordo com a literatura, observam-se duas abordagens relacionadas ao planejamento de experimentos. A primeira envolve uma avaliação inicial, geralmente feita a partir de um planejamento fatorial completo ou fracionário, visando estabelecer os fatores principais na análise para o direcionamento de um estudo mais aprofundado e a segunda abordagem é a apresentação de um segundo planejamento que acrescente informações ao primeiro, a partir de informações mais específicas, como a construção de superfícies de resposta (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Neste caso como as variáveis importantes no processo já haviam sido determinadas, que são a constituição da solução tampão e o tempo de focalização, partiu-se para a segunda abordagem, onde foram construídas as superfícies de resposta que nos levaram a melhor condição experimental.

Desta forma, foram delineados experimentos através de planejamento fatorial completo 3^2 , o que resultou em 9 experimentos. Neste planejamento foram analisadas 2 variáveis em 3 níveis e posteriormente foi feita a análise da superfície de resposta.

Com esta estratégia multivariada, foi determinado quais os níveis dos fatores avaliados levariam a um ótimo do experimento, quais as possíveis interações entre esses fatores e este modelo também foi utilizado para detectar a curvatura da função resposta, para saber se ela passa por um máximo, que corresponde ao valor ótimo das condições avaliadas.

A partir da combinação dos fatores e níveis de investigação, foi possível chegar até o diagrama de Pareto apresentado na Figura 9 (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Figura 9: Diagrama de Pareto relacionando o numero de bandas eletroforéticas e as condições experimentais para eletroforese bidimensional



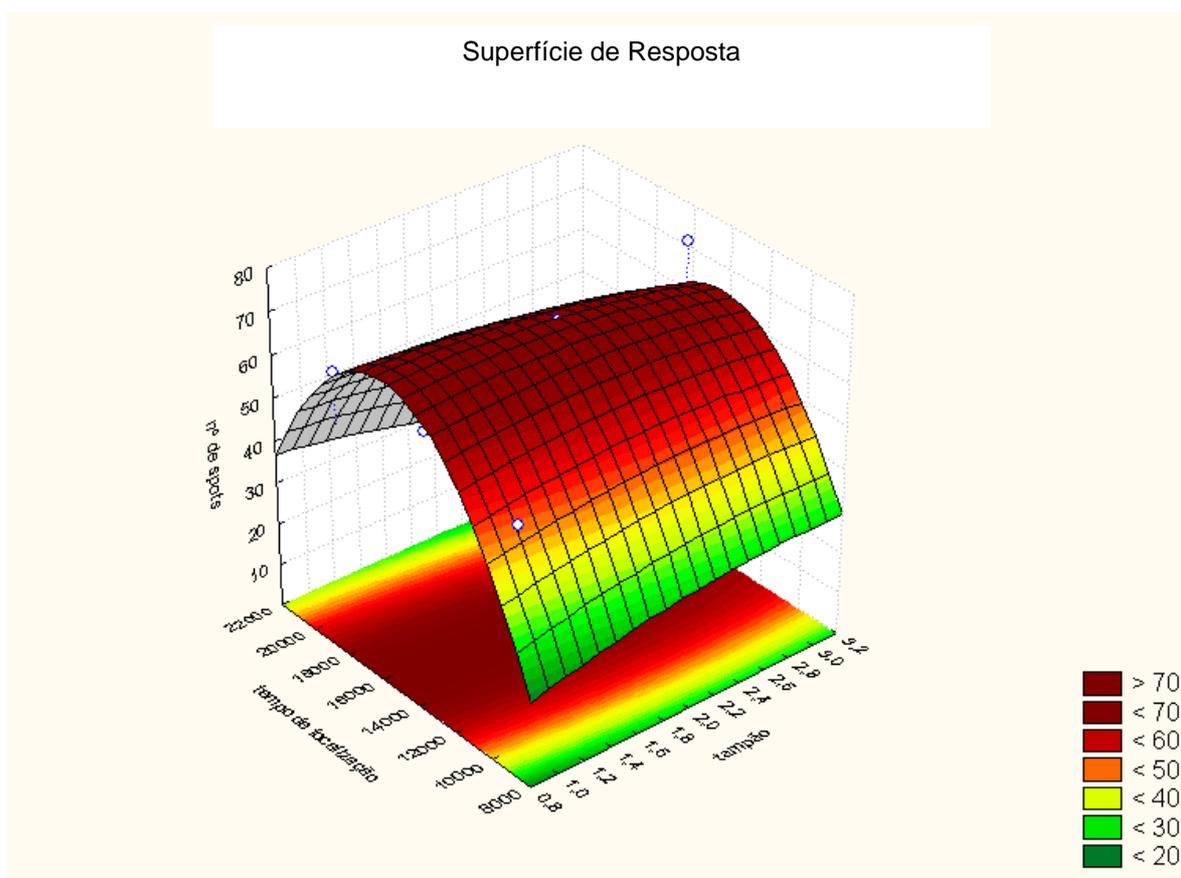
O diagrama de Pareto apresenta de forma clara e dinâmica os efeitos que são estatisticamente importantes dentro do planejamento. A avaliação do Pareto deve ser feita levando em conta a linha divisória de $p = 0,05$. Os efeitos cujos retângulos estiverem a direita da linha divisória são considerados estatisticamente significativos e devem ser considerados no modelo matemático.

Desta maneira, analisando o diagrama apresentado na figura 9 pode-se verificar que o efeito mais importante foi o tempo de focalização. Embora este fator não tenha se apresentado a direita da linha divisória de Pareto, a sua proximidade com a mesma o torna marginalmente significativo, o que indica que é uma variável importante dentro do planejamento, como já se esperava.

Já a composição da solução tampão encontra-se distante da linha divisória, o que nos levaria a crer, que esta variável não exerce influência na otimização deste experimento. Este resultado vai de encontro com as observações realizadas na prática e leva a crer que possivelmente haveria alguma falha no modelo empregado, já que observou-se que a composição da solução tampão estava diretamente relacionada com a qualidade do mapa proteômico obtido.

O resultado apresentado no diagrama de Pareto, também pode ser melhor visualizado a partir da análise da superfície de resposta apresentada na figura 10.

Figura 10: Superfície de resposta

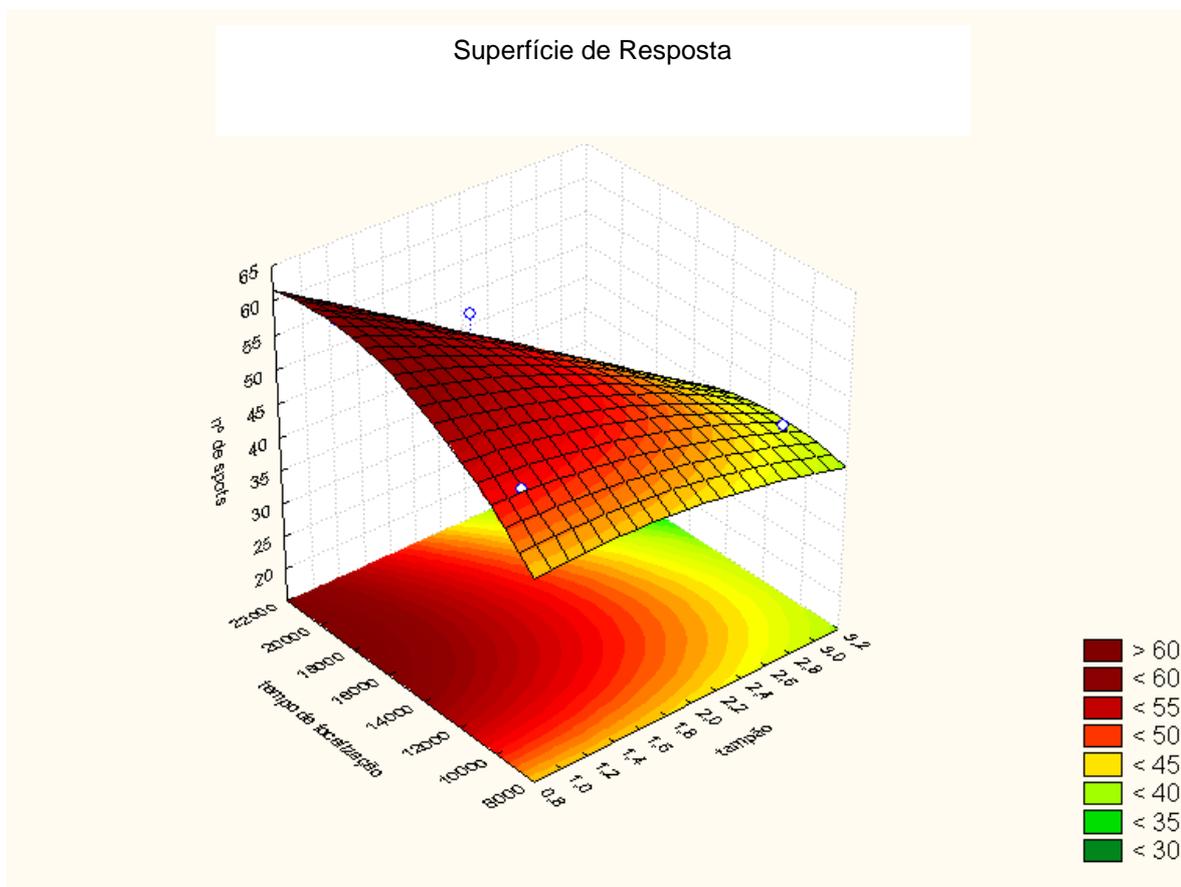


Na figura 10, observa-se que a região vermelha aponta para a melhor condição experimental, ou seja, neste caso a condição onde são encontrados o maior número de *spots*. A análise desta superfície mostra que a composição do tampão não exerce influência na otimização do experimento.

Investigando as razões para tal comportamento, concluiu-se que a variável de resposta adotada, número de *spots*, talvez não fosse suficiente para representar adequadamente o comportamento apresentado, já que além do número de *spots*, a resolução obtida entre eles também é um componente importante. Como o programa de tratamento de imagens empregado na análise dos géis obtidos a partir da eletroforese bidimensional não possui ferramenta capaz de fornecer a resolução entre os *spots*, os dados foram tratados novamente, excluindo *outliers*, utilizando o critério do bom senso analítico (MILLER & MILLER, 1984).

Desta forma, foi gerada uma nova superfície de resposta, apresentada na figura 11.

Figura 11: Superfície de resposta.

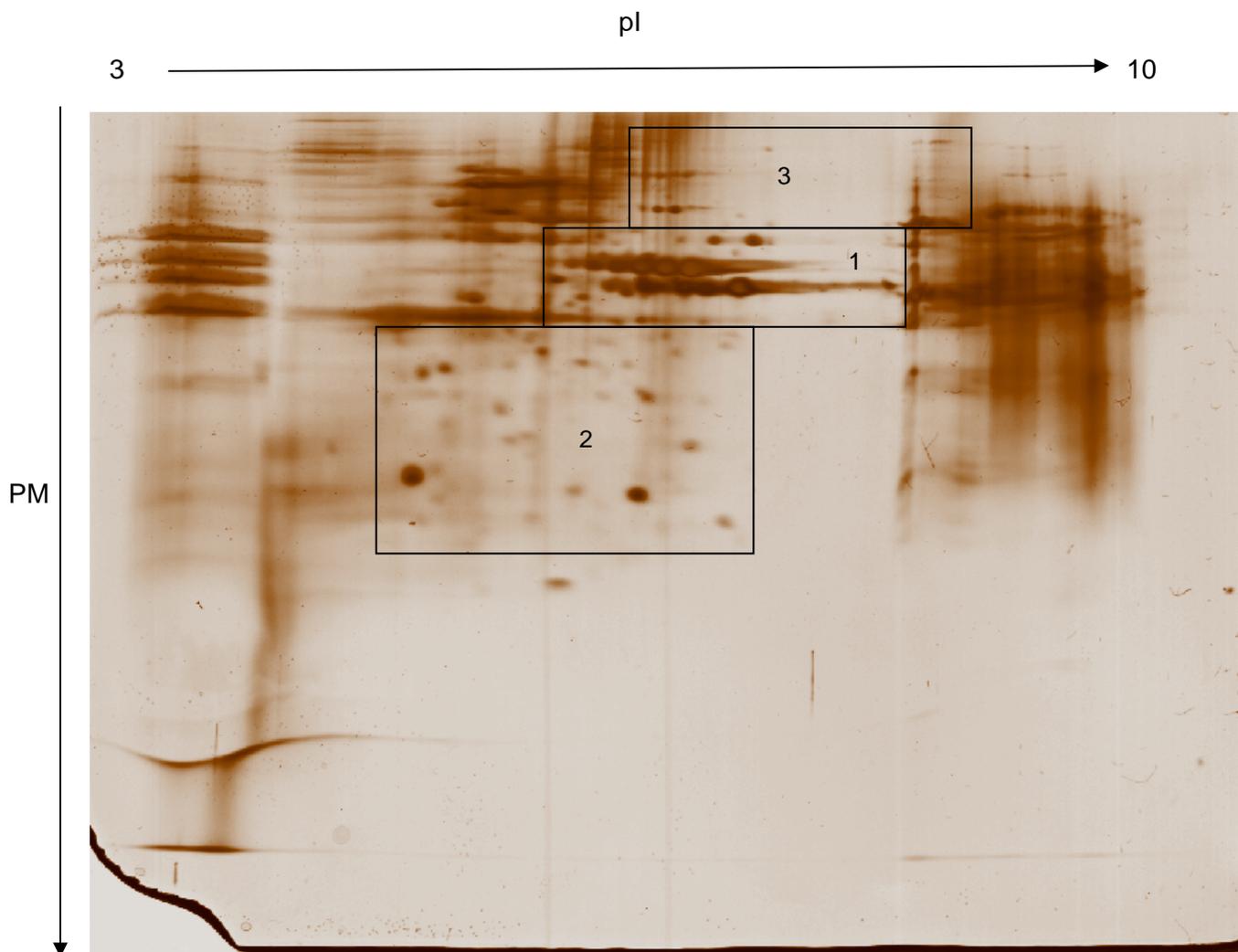


Analisando a superfície de resposta apresentada na figura 11, foi possível verificar que tanto o tempo de focalização quanto a composição do tampão foram variáveis importantes na obtenção de um número de spots elevados com resolução satisfatória.

Desta forma, estes dados apontam como sendo a melhor condição para o mapa proteômico das proteínas presentes nas preparações de OMV, a utilização da solução tampão 1 com o tempo de focalização de 20.000 Vh, tira de pH variando de 3-10 e concentração de PAGE 12%.

A partir desta otimização deu-se continuidade aos estudos de caracterização protéica que se seguem. Na figura 12 é mostrado um típico mapa proteômico obtido com essas preparações.

Figura 12: Eletroforese bidimensional de preparações de OMV. Foi aplicado 125 μ L de amostra, foi utilizada uma tira de 7 cm com variação de pH 3 – 10, na primeira dimensão foi utilizado o Mini-Protean II Cell e na segunda dimensão foi utilizado o Mini-Protean III com gel de SDS-PAGE a 12%.



O gel obtido foi dividido em 3 regiões distintas. Na região 1 há um grande número de bandas eletroforéticas com peso molecular semelhante e diferentes pontos isoelétricos. Essa distribuição de bandas eletroforéticas pode ser relacionados com os monômeros de PorA e/ou PorB. Com essa faixa de peso molecular também é descrita a *Neisserial adhesin A* (NadA) (Vipond et al, 2006).

Na região 2, foram observados bandas eletroforéticas de menor peso molecular, que focalizaram em pH ácido. Foi observada também uma variação maior de pI e PM do que a observada nas regiões anteriores, o que sugere que há uma maior variabilidade de proteínas. Trabalhos anteriores sugerem que

esses bandas eletroforéticas estejam relacionadas com os antígenos *factor H binding protein* (fHBP), NspA, RmPM.

Na região 3 as bandas eletroforéticas apresentam peso molecular superior a região 1, também com uma grande distribuição de isoformas e uma intensidade menor dos *spots*. Essa região foi associada a associações de PorA e PorB que apresentam massa molecular na faixa de 100-110 kDa e *pI* variando de 6,0 a 7,0 (Vipond et al, 2006). Outra proteína que pode estar presente nesse quadro é o antígeno Omp85.

Além da avaliação quantitativa e imunogênica das preparações de OMV, a eletroforese bidimensional possibilita a avaliação da consistência de produção de vacinas produzidas por esta tecnologia, o que no caso de vacinas de OMV acaba sendo uma preocupação, devido a natureza complexa deste tipo de preparação.

Por outro lado, embora a eletroforese bidimensional seja uma ferramenta poderosa na separação de proteínas, ela também apresenta alguns inconvenientes. Proteínas que apresentam alto peso molecular, proteínas muito hidrofóbicas e proteínas muito básicas não apresentam uma boa separação na eletroforese bidimensional. Neste caso, se encontram a Fet A e a NspA, ambos antígenos com *pI* básico.

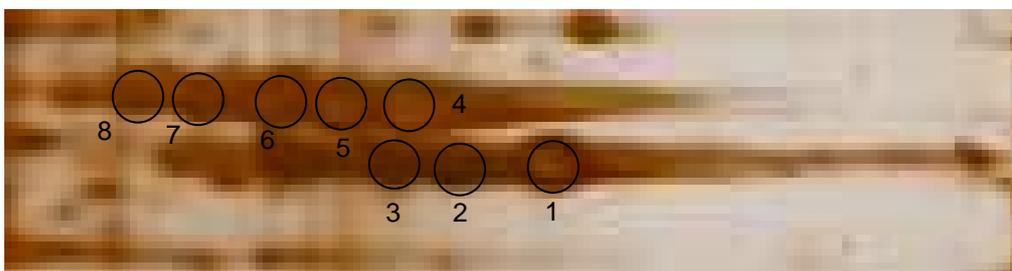
Uma alternativa para a análise proteômica total das OMVs, já que na eletroforese bidimensional foram detectadas perdas e falhas na identificação de antígenos importantes, foi a utilização da espectrometria de massas.

4.3 HIDRÓLISE TRÍPTICA, ESPECTROMETRIA DE MASSAS E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS ELETROFORÉTICAS

Para uma visualização das bandas eletroforéticas, as regiões 1,2, e 3 da figura 12 foram ampliadas e apresentadas nas figuras 13, 15 e 16. Em cada região as bandas presentes em maior quantidade e melhor resolução foram selecionadas do gel obtido pela eletroforese bidimensional e submetidos à hidrólise trípica.

A primeira tentativa de identificação das proteínas presentes nas bandas foi o uso da técnica de PMF. Algumas proteínas não foram identificadas por esse método, sendo utilizada a espectrometria de massas seqüencial (EM seqüencial) para a identificação dessas bandas.

Figura 13: Bandas eletroforéticas assinalados na região 1 (figura 12) identificados por EM.



Na região 1, figura 13, foram identificadas as principais proteínas de membrana externa, porinas do tipo A e B. As bandas 1, 2, 3 e 4 foram identificadas como porinas B. Houve uma diferença entre os pIs observados e os descritos para essas proteínas, provavelmente devido a grande variabilidade das alças externas dessas porinas.

A banda 5 foi identificada como a porina A, sendo observada a mesma diferença em relação ao pI. O score obtido para essa banda foi bastante elevado (121). Por esse motivo avaliou-se esse espectro mais criteriosamente. Dos 21 picos presentes no espectro de massas, um total de 10 peptídeos foram identificados pelo Mascot. Dos onze peptídeos não identificados, um peptídeo (m/z 1009,58) provavelmente corresponde a região N terminal da

proteína, que provavelmente o Mascot não identificou, por ser a sequência próxima ao peptídeo de sinalização.

Figura 14: (A) - Sequência da proteína identificada na banda 5 (código de acesso [OMP3_NEIMB](#)). Os aminoácidos sublinhados correspondem ao peptídeo de sinalização. Em vermelho são mostrados os peptídeos identificados no PMF. Em fonte 12, itálico e negrito as alças variáveis. Em preto os peptídeos não identificados. O peptídeo sombreado corresponde a identificação que não foi feita pelo Mascot. (B) – Estrutura tridimensional da OMP3 MEIMB.

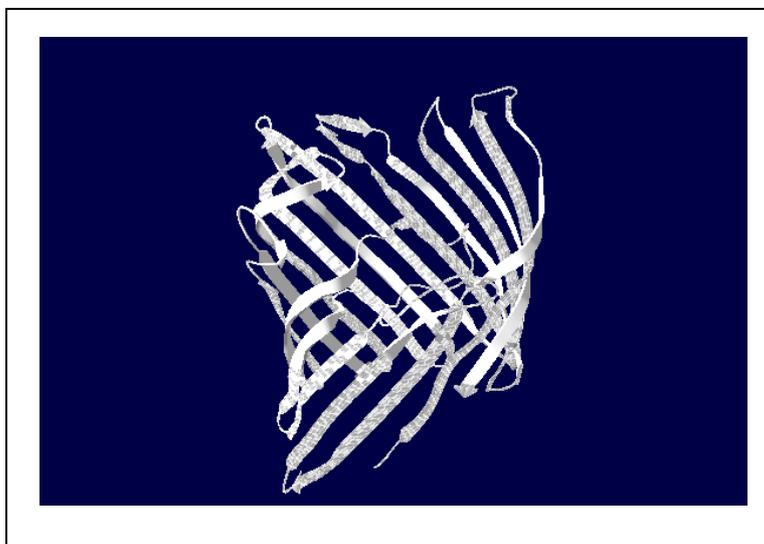
(A)

```

1  MKKSLIALTL AALPVAAMAD VTLYGTIKAG VETSRSVEHN GGQVSVETG
51  TGIVDLGSKI GFKGQEDLGN GLKAIWQVEQ KASIAGTDSG WGNRQSFIGL
101 KGGFGKLRVG RLNSVLKDTG DINPWDSKSD YLGVNKIAEP EARLISVRYD
151 SPEFAGLSGS VQYALNDNAG KYNSESYHAG FNYKNGGFFV QYGGAYKRHV
201 RVDENVNIEK YQIHRLVSGSY DNDALHASVA VQQQDAKLVE DNYSHNSQTE
251 VAATLAYRFG NVTPRVSYAH GFKGSFDDAD LSNDYDQVVV GAEYDFSKRT
301 SALVSAGWLQ EGKGENKFVS TAGGVGLRHK F

```

(B)



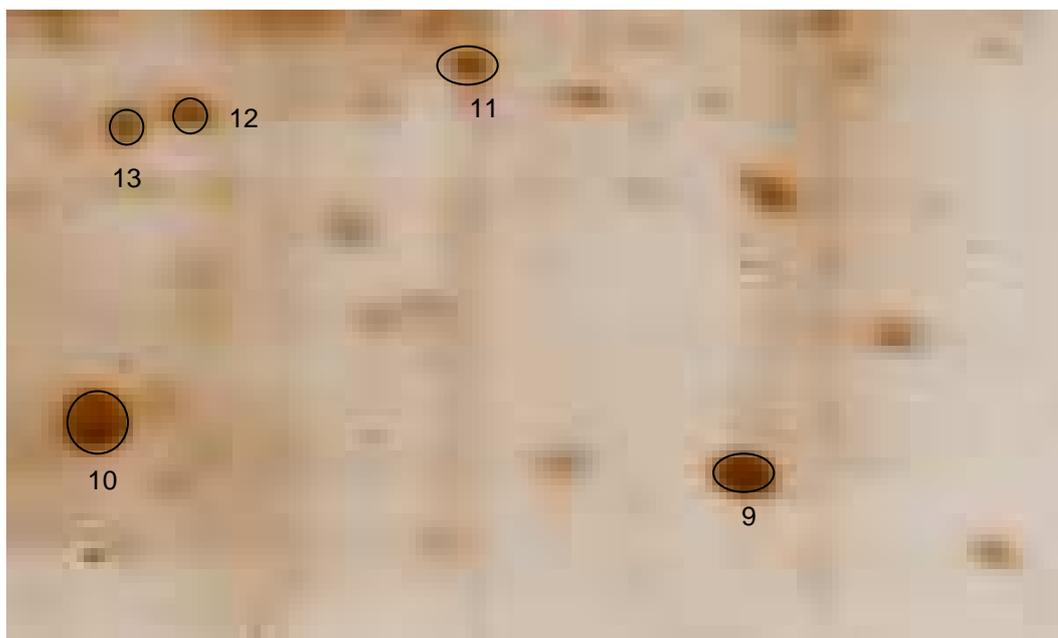
Os peptídeos não identificados provavelmente estão relacionados às regiões variáveis da porina A. Essas porinas apresentam oito *loops* expostos na superfície da membrana externa, com três regiões variáveis (DE FILIPPIS, 2007), o que possibilita a existência de várias isoformas com pls diferentes,

devido a variações da sequência. Dos 11 peptídeos identificados, 5 estão associados as regiões variáveis, 3 constantes, conforme a figura 14.

Com o mesmo peso molecular foram observados as bandas 6, 7 e 8. As duas primeiras foram identificadas como uma proteína de membrana externa, cuja função biológica ainda não está elucidada, porém presente em formulações vacinais (VIPOND et al, 2005).

Já a banda 8 foi identificada como uma proteína de membrana externa que liga-se LOS. Essa proteína já foi detectada anteriormente em formulações vacinais, embora a sua importância para a imunização não seja conhecida. (VIPOND et al, 2005).

Figura 15: Bandas eletroforéticas assinalados na região 2 (figura 12) identificados por EM.



A região 2, figura 15, foram identificadas as bandas 9, 10, 11, 12 e 13, correspondente as proteínas de menor peso molecular. Essas proteínas são componentes minoritários da preparação, tanto em variedade quanto em concentração, quando comparadas com a região 1.

A banda 9 foi identificado como bacterioferritina, proteína citoplasmática responsável por ligar íons ferro. Embora essa proteína seja citoplasmática, consideramos a identificação porque em *Neisseria* há a expressão de proteínas

de captação de ferro na membrana externa, especialmente em preparações vacinais (VIPOND et al, 2005). Possivelmente essa banda é um fragmento de proteína de captação de ferro da membrana, já que proteínas de membrana de captação de ferro apresentam PM mais elevado.

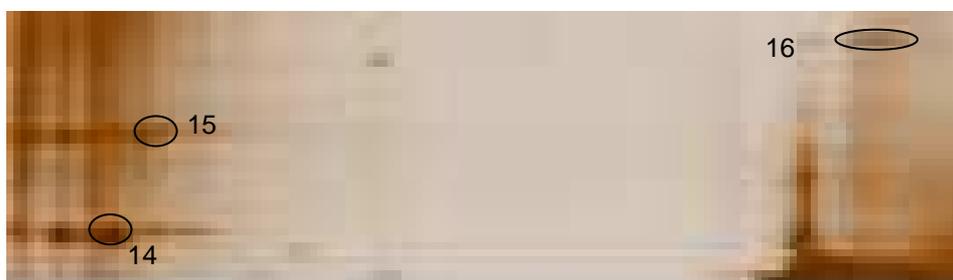
A banda 10 foi identificada como a *Opacity-related protein 3* (OPR3), proteína de membrana que ajuda na fixação da bactéria a superfície do epitélio do hospedeiro. Proteínas dessa classe têm sido estudadas recentemente como candidatas a antígeno vacinal, por sua elevada imunogenicidade (CALLAGHAN et al., 2011).

A banda 11 foi identificada como uma enzima envolvida na biossíntese do LOS, através da ativação do KDO para sua incorporação a estrutura do oligossacarídeo (PENG et al., 2008).

A banda 12 foi identificada como uma proteína de membrana externa da classe 4, conhecida como OmpA. Essa proteína é funcionalmente importante para a membrana pela sua interação com as porinas e o peptidilglicano. Esse tipo de proteína é importante para a imunização em vacinas a base de vesículas. (GRIZOT & BUCHANAN, 2004).

A banda 13 foi identificada como a lipoproteína LolA. Essa lipoproteína está envolvida no transporte de componentes pelo espaço periplasmático para a membrana externa, não tendo sido reportada sua influência na resposta imune (TETTELIN et al., 2000).

Figura 16: Bandas eletroforéticas assinalados na região 3 (figura 12) identificados por EM.



Na região três, figuras 16, 3 bandas eletroforéticas, 14, 15 e 16 foram identificadas e correspondem as proteínas de maior peso molecular. Duas

bandas foram associadas a proteínas importantes para a captação de ferro pela bactéria. A primeira proteína corresponde a banda 14, que foi identificada como uma proteína carreadora de íons ferro, função semelhante a encontrada para a proteína identificada na banda 9, figura 15. A banda 16 foi identificada como uma proteína de membrana que está presente em formulações vacinais, a TonB (VIPOND et al., 2005). Essa proteína é relevante para a captação de ferro pela bactéria, via interação com proteínas transportadoras de ferro do hospedeiro (VIPOND et al., 2005).

Finalmente, a banda 15 foi identificada como a Omp85, proteína de membrana externa que é considerada um antígeno chave na produção de anticorpos importantes para a imunização (VIPOND et al. 2006).

A identificação dessas 16 proteínas é importante, porém outros antígenos importantes não foram identificados. Embora os mecanismos de resposta oferecidos pelas OMVs sejam entendidos apenas parcialmente, existem evidências de que um número de antígenos chave são fundamentais na produção de anticorpos, alguns desses antígenos não foram identificados e são apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Antígenos chave na produção de anticorpos anti-OMV, não identificados

Antígeno	PM
FetA	79000
fHBP	29000

Possivelmente a não detecção desses antígenos deve-se a escala de preparo do material, que foi pequena. Uma preparação em maior escala poderia favorecer a identificação desses antígenos.

As demais bandas foram identificadas com baixos scores, sendo relacionados a proteínas citoplasmáticas. Estas proteínas foram classificadas como enzimas envolvidas em várias vias metabólicas, proteínas ribossomais, proteínas associadas ao metabolismo do DNA e algumas proteínas hipotéticas. Essas identificações estão relacionadas na tabela 15.

Tabela 15: Resumo de proteínas identificadas por eletroforese bidimensional em preparações de OMV.

PROTEÍNAS	FUNÇÃO
Proteína ribossomal	Síntese de proteínas
Fosfopantenoína adenil transferase	Síntese de CoA
Fosfometil pirimidina sintase	Síntese de bases nitrogenadas
Dihidrorato desidrogenase	Degradação de nucleosídeos
Endodesoxiribonuclease	Intermediário de recombinação genética
UDP-N-acetilglucosamina 6-acetil transferase	Biosíntese de peptídeo glicano
mutL – proteína de reparo de DNA	Reparo de DNA
Chaperona	Conformação de proteínas
Fosforibosil-AMP-ciclohidrolase	Síntese de aminoácidos
Histidinol desidrogenase	Síntese de aminoácidos
UDP-N-acetilglucosamina 6-acetil transferase	Biosíntese de lipídeo A

Como é possível observar na tabela anterior, algumas das proteínas identificadas estão envolvidas com síntese ou degradação de estruturas de superfície do meningococo, biosíntese e metabolismo, proteína ribossomal e chaperonas. Embora estas proteínas não sejam classificadas como proteínas de membrana, todas são compatíveis com o microrganismo em questão e já foram identificadas anteriormente em preparações de OMV (VIPOND, et al., 2006).

4.4 DETERMINAÇÃO DO SORO CONVERSÃO EM CAMUNDONGOS

A ausência de detecção de antígenos de baixo peso molecular importantes nas preparações pode ser uma consequência da baixa concentração que esse material geralmente é expresso, além das dificuldades intrínsecas da eletroforese bidimensional, já mencionadas anteriormente. Por esse motivo foi estudada a soro conversão das OMVs preparadas, para averiguar se havia um método imunológico que fosse possível para identificar esses antígenos.

Sabe-se que muitos antígenos que estão presentes em quantidades elevadas nem sempre apresentam imunogenicidade compatível com a sua quantidade.

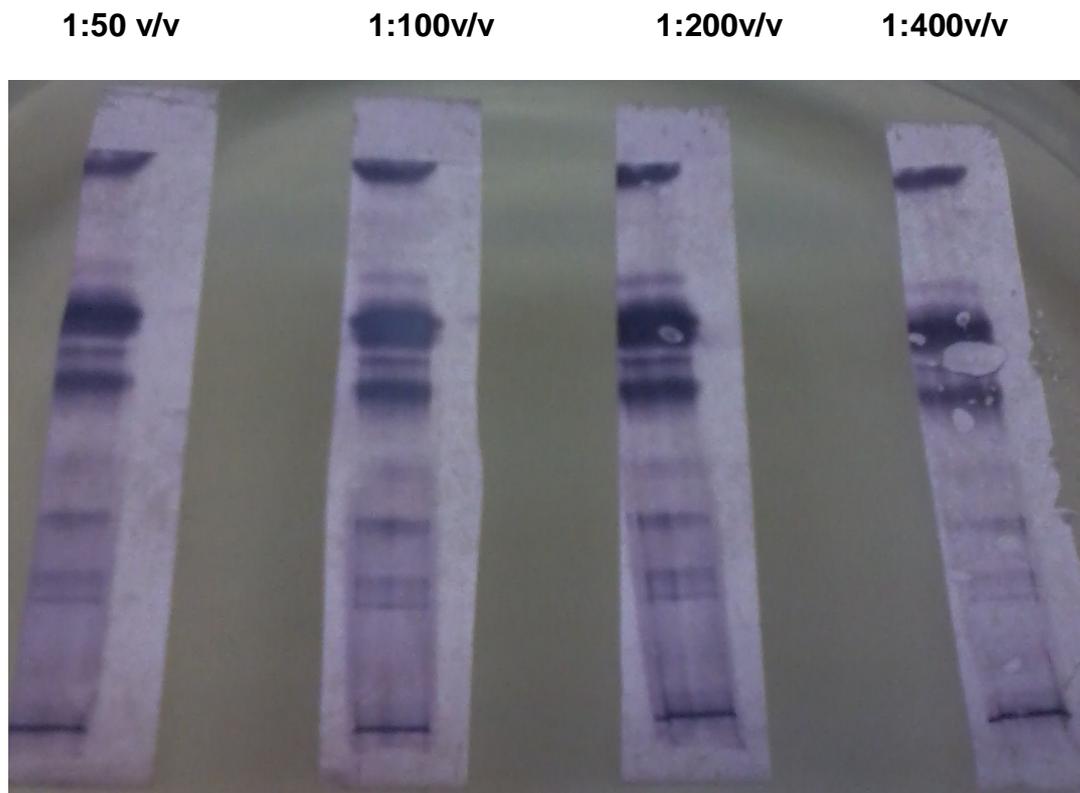
Desta forma, com o objetivo de comparar e verificar a existência ou não de relação entre a quantidade de antígeno e o seu potencial imunogênico, foi desenvolvida esta metodologia de imunoreação em membrana.

Para esse fim, foram produzidos anticorpos policlonais murinos anti-OMV. Também foi necessário avaliar a soro conversão e assim verificar qual era a diluição máxima, onde ainda seria possível visualizar o reconhecimento do antígeno (OMV) pelos anticorpos.

Para a avaliação da soro conversão, foi realizado um *imunoblot*. Neste procedimento utilizou-se a preparação de OMV, e para a revelação foi utilizado o *pool* de soros dos animais imunizados, contendo os anticorpos. Foi montado um esquema de diluições do soro de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 v/v.

Analisando as membranas reveladas com as diferentes diluições do soro, (figura 17) foi possível verificar o aparecimento de bandas relativas aos antígenos pesquisados, para todas as diluições empregadas.

Figura 17: *Imunoblot* utilizado nos estudos de soro conversão.



Como o objetivo da determinação da melhor diluição é aplicar estas condições em métodos de imunoreação em membrana para a detecção de antígenos protéicos presentes em vacinas antimeningocócicas sorogrupo B, optou-se por trabalhar com o soro da diluição de 1:200 v/v, para garantir a visualização até mesmo dos antígenos presentes em quantidades pequenas nas preparações.

A próxima etapa foi preparar o *imunoblot* a partir de um gel bidimensional.

4.5 REVELAÇÃO DO GEL DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL POR IMUNOBLOT

Com o objetivo de comparar e verificar a existência ou não de relação entre a quantidade de antígeno e o seu potencial imunogênico, foi desenvolvida esta metodologia de imunoreação em membrana (SUNG, J. W., ET AL., 2010).

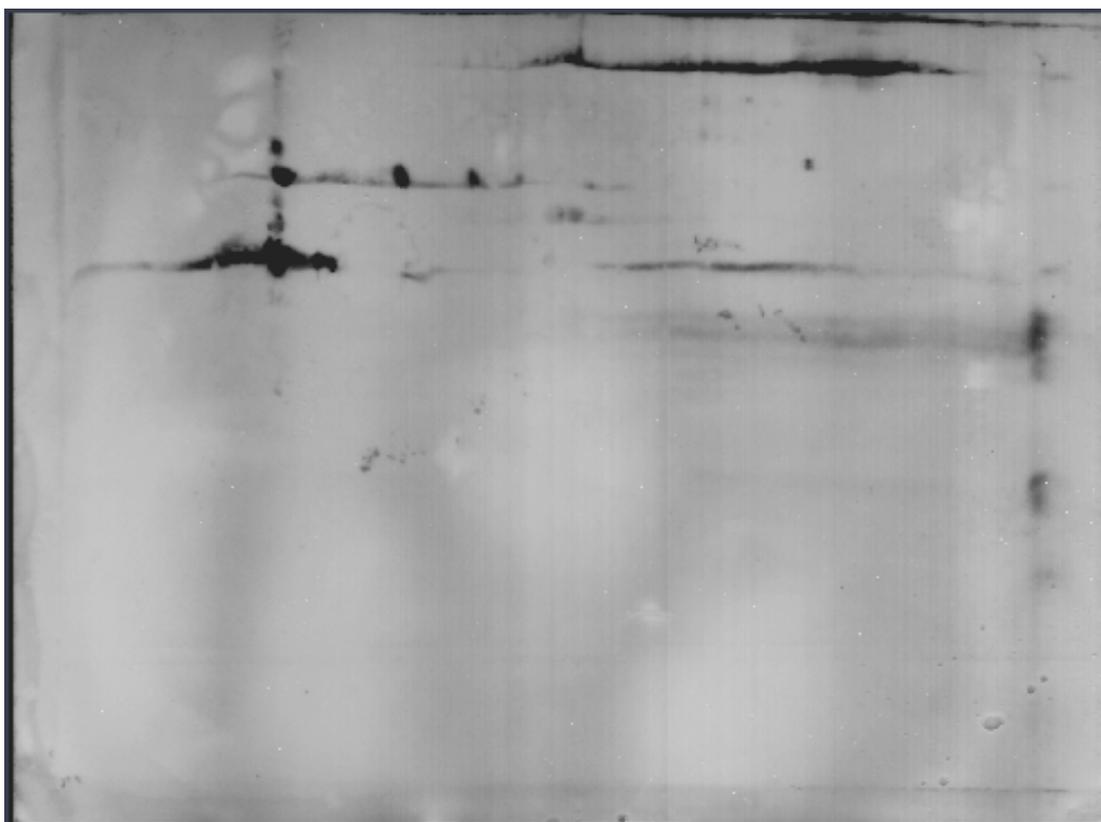
Para a análise da imunoreação em membrana, apresentado na figura 18, foi feita uma comparação da mesma, com o gel bidimensional revelado pelo método da prata apresentado na figura 12. Quando esta comparação é feita, pode-se perceber que o número bandas eletroforéticas coradas no gel é superior ao número de bandas detectadas pelo método imunológico.

Os resultados demonstraram que houve uma grande formação de anticorpos contra as porinas, monoméricas em associações, e contra outras proteínas de alto peso, como a Omp85.

Houve pouca soroconversão para as proteínas de baixo peso molecular, não sendo possível identificar antígenos como a FHBp. Possivelmente, no soro policlonal anti OMV anticorpos contra essa proteína podem estar presentes em concentrações muito pequenas.

Por outro lado, sabe-se que existem estudos de desenvolvimento de vacinas baseadas em proteínas de baixo peso molecular, que apresentam elevado potencial imunogênico, nestes trabalhos são utilizadas preparações recombinantes, onde a quantidade destas proteínas é bem maior.

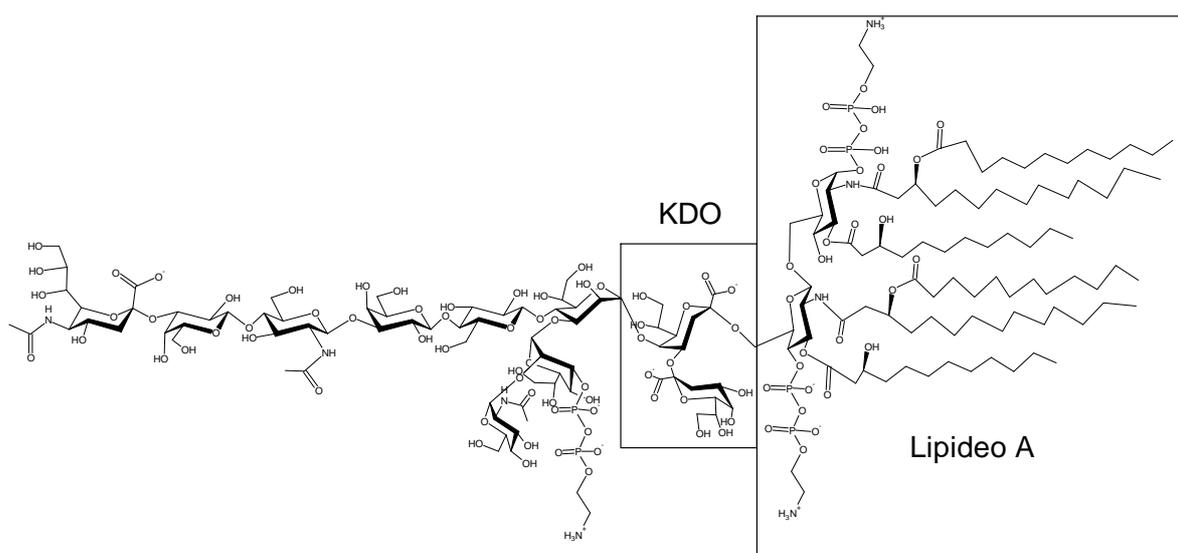
Figura 18: Blot do gel de eletroforese bidimensional revelado com anticorpo anti-OMV



4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LOS

Os antígenos mais importantes para a imunização contra a meningite B são as proteínas da vesícula da membrana externa. Apesar de sua importância, outros antígenos presentes na OMV são importantes. O mais importante antígeno não proteico é o LOS, devido a seu efeito adjuvante. Essa propriedade de aumentar a resposta imune deve-se a manutenção da conformação nativa das proteínas, além de estimular a proliferação de células de defesa. Na figura 19, é apresentada a estrutura Lipo oligo sacarídica do LOS. Esse tipo de estrutura ajuda a estabilizar a OMV, assim como estimula a produção de anticorpos contra a vesícula (SANDERS, et al., 2011).

Figura 19: Estrutura do LPS – imunotipo IL3



A cadeia o-específica do LOS é formada por um oligossacarídeo formado por unidades que se repetem de um glicídeo de 8 carbonos denominado KDO (ácido 2-ceto-3-deoxioctulosônico) e a parte hidrofóbica do LOS é constituída por ácidos graxos, denominada lipídeo A (PAVLIAK, 1993).

Trabalhos de caracterização de LOS demonstraram que o KDO e o ácido graxo hidroxilado, presente no lipídeo A, podem funcionar como marcadores químicos da estrutura do LPS (CAROFF, 2003).

Os principais ensaios, atualmente empregados, para determinação do conteúdo de LPS ou LOS são o ensaio de pirogênio em coelho e ensaio de lisado de amebócito de limulus (LAL) (LIN et al., 2007). Apesar do grande uso destes ensaios, eles apresentam limitações. No caso do Pirogênio, determinadas substâncias podem provocar o aumento da temperatura dos coelhos, sem apresentar essa característica em seres humanos (BRAUN & KLEIN, 1960).

No caso do LAL, o método se fundamenta em uma série de reações enzimáticas que podem ser inibidas por vários agentes, como por exemplo, outras biomoléculas que não sejam o LPS ou LOS, e isso se torna um problema quando se trata de vacinas (MUNFORD et al., 1984).

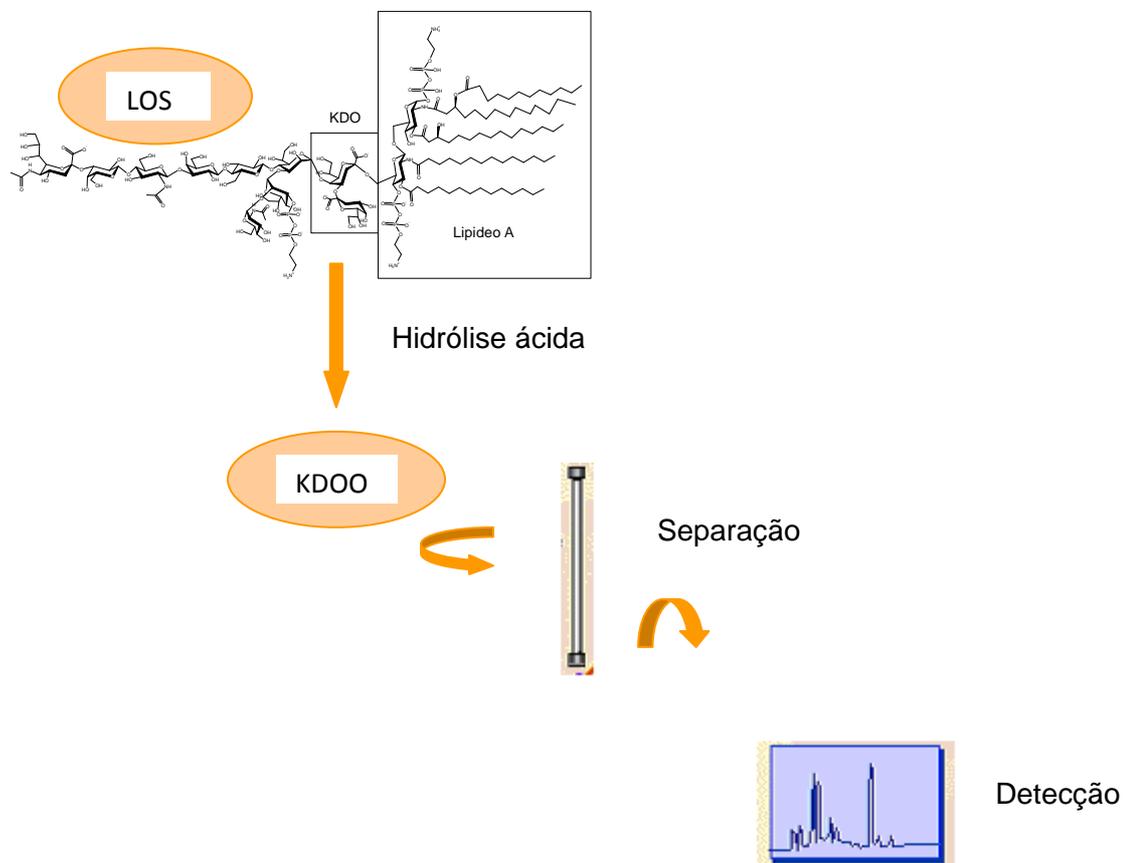
Além disso, métodos físico-químicos para a dosagem de LOS têm sido desenvolvidos, como uma alternativa para os ensaios biológicos (SUNG, J. W., et al., 2010). Tais métodos são a eletroforese em gel de poliacrilamida, a cromatografia gasosa e líquida e a espectrofotometria (SONESSON, 1990). A determinação espectrofotométrica apresenta baixa sensibilidade, tendo desta forma, seu uso restrito a preparações onde a endotoxina se encontra em elevada concentração. Os métodos eletroforéticos e cromatográficos são os mais sensíveis, podendo ser aplicados a pequenas concentrações de LOS.

Dentro das técnicas físico-químicas, destaca-se a cromatografia líquida de troca iônica com detector amperométrico pulsado, que é uma técnica de análise de carboidratos desenvolvida pela empresa Dionex. Nesta técnica os

carboidratos se ionizam em pH alcalino, sendo desta forma separados em uma coluna de troca iônica. A detecção é feita com auxílio de um detector amperométrico, que apresenta elevada sensibilidade aos carboidratos, sendo possível detectá-los em quantidades muito pequenas sem que seja necessário derivatizá-los (KIANG, et al., 1997).

A análise do LOS, por essa metodologia é fundamentada em uma hidrólise ácida do LOS, liberando os monômeros de KDO (KIANG, et al., 1997). Esses monômeros são analisados no cromatógrafo, estabelecendo-se uma correlação entre as áreas dos picos e as concentrações de KDO. Como padrão de análise foi utilizada uma preparação de LOS de referência. A partir do conteúdo de KDO, foi possível quantificar o teor de LOS na vacina. O esquema da análise está apresentado na figura 20.

Figura 20 :Esquema de análise de KDO, por cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada.



Neste trabalho foram desenvolvidas as condições de hidrólise ácida, assim como as condições cromatográficas necessárias a quantificação de LOS nas preparações vacinais. Após o desenvolvimento destas condições seguiu-se a validação da metodologia.

4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE KDO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA ANIÔNICA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA PULSADA.

De acordo com a NBR ISO 9000, validação é o conjunto de operações necessárias para comprovar que um determinado procedimento analítico é adequado para finalidade pretendida (INMETRO, 2003). Para atender a esta definição alguns parâmetros analíticos foram verificados após o desenvolvimento da metodologia de dosagem de KDO por cromatografia líquida de troca iônica com detecção amperométrica pulsada.

4.7.1 Linearidade

4.7.1.1 Avaliação da homocedasticidade do método

Antes de verificar a linearidade do método em questão é necessário verificar se o modelo linear se aplica às características do método. Para isto, os resultados obtidos para as triplicatas dos pontos da curva de calibração foram submetidos ao teste estatístico, chamado de teste de Cockran.

Caso o critério de homocedasticidade seja cumprido, a curva de calibração será calculada pelo método dos mínimos quadrados. Caso contrário, a curva será calculada pelo método dos mínimos quadrados ponderados pelo intervalo da concentração ($1/x$).

A linearidade de um procedimento analítico representa sua capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais a concentração das substâncias a serem analisadas em um determinado intervalo de tempo e pode ser determinada através da curva de calibração, que em nosso caso por se tratar de um método cromatográfico, se dará através da plotagem de concentração *versus* área.

A linearidade de um método analítico deve ser interpretada com auxílio de alguns parâmetros matemáticos, como: Coeficiente de correlação, intercepto e inclinação da reta.

Nas curvas de calibração utilizadas para estudos de linearidade foram analisados 5 pontos, em triplicata cada ponto ($n=3$). O coeficiente de correlação, que nada mais é do que a relação entre x/y , deve possuir uma variação de $\pm 0,001$ absoluto, ou seja, o r deve estar perto de 0,999. O valor do coeficiente de correlação linear deve ser avaliado levando em consideração a natureza do método analítico, assim como sua própria necessidade de trabalho.

Outro parâmetro a ser levado em consideração quando estamos avaliando linearidade de um método é o valor do intercepto. Quando trabalhamos com métodos físico-químicos, teoricamente, para uma concentração igual a zero espera-se encontrar uma resposta igual a zero, porém na prática isso não é verificado. Quando a curva de calibração é calculada, por regressão linear, a melhor reta encontrada dificilmente passa pelo ponto (0,0), ou seja, existe um ponto de intercepto. O método é considerado linear quando o intercepto estiver dentro do intervalo de confiança. Se isso acontecer, o método está trabalhando apenas com erros aleatórios.

O cálculo da curva de calibração é feito a partir da distribuição normal dos pontos, e a reta encontrada fornecerá o erro padrão. Este erro é determinado a partir do desvio da distribuição normal teórica e da experimental. Sendo assim o programa estatístico utilizado irá executar um teste t que fará a verificação deste desvio para o número de níveis de concentração analisados para $n-2$ graus de liberdade, no caso de curva de calibração calculadas por regressão linear. Desta forma, o teste t avalia se os desvios entre os valores teóricos e experimentais irão comprometer a linearidade.

Se o valor de t encontrado for menor do que o valor de t tabelado, para $n-2$ graus de liberdade, o método é linear e a inclinação da reta está dentro do intervalo de confiança.

Os resultados obtidos para as 3 curvas de calibração utilizadas nos estudos de linearidade estão apresentados nas tabelas 16,17 e 18.

Tabela 16: Resultados obtidos para a curva de calibração – dia 1

Tempo de retenção KDO (min)	Área do pico KDO	Concentração KDO ($\mu\text{g/mL}$)
8,25	0,178	5,25
8,25	0,181	5,25
8,23	0,175	5,25
8,25	0,380	10,5
8,23	0,373	10,5
8,23	0,369	10,5
8,22	2,015	52,5
8,23	2,253	52,5
8,22	2,196	52,5
8,20	4,400	105,0
8,20	4,570	105,0
8,20	4,574	105,0
8,18	6,882	157,5
8,18	6,901	157,5
8,17	6,880	157,5

Tabela 17: Resultados obtidos para a curva de calibração – dia 2

Tempo de retenção KDO (min)	Área do pico KDO	Concentração KDO $\mu\text{g/mL}$
8,15	0,143	5,135
8,12	0,175	5,135
8,10	0,143	5,135
8,12	0,301	9,875
8,12	0,293	9,875
8,12	0,293	9,875
8,10	1,480	49,77
8,10	1,487	49,77
8,08	1,488	49,77
8,08	3,006	99,94
8,08	3,033	99,94
8,07	3,024	99,94
8,05	4,860	159,98
8,07	4,856	159,98
8,05	4,843	159,98

Tabela 18: Resultados obtidos para a curva de calibração – dia 3

Tempo de retenção KDO(min)	Área do pico KDO	Concentração KDO µg/mL
8,38	0,151	5,135
8,35	0,150	5,135
8,30	0,151	5,135
8,28	0,286	9,875
8,33	0,287	9,875
8,43	0,287	9,875
8,43	1,432	49,77
8,42	1,1458	49,77
8,43	1,455	49,77
8,40	2,933	99,94
8,38	2,928	99,94
8,38	2,942	99,94
8,37	4,710	159,98
8,38	4,727	159,98
8,35	4,734	159,98

Para cada grupo de resultados apresentados nas curvas de calibração do dia 1, 2 e 3 foi avaliada a homocedasticidade, assim como foi feita a pesquisa de valores aberrantes antes de avaliar os parâmetros envolvidos nos estudos de linearidade. Os resultados da avaliação de homocedasticidade e a pesquisa de valores aberrantes são apresentados nas tabelas 19, 20 e 21.

Tabela 19: Pesquisa de valores aberrantes e avaliação da homocedasticidade – dia 1

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Área 1	0,178	0,38	2,015	4,595	6,882
Área 2	0,181	0,373	2,253	4,4	6,901
Área 3	0,175	0,369	2,196	4,574	6,88
Média	0,1780	0,3740	2,1547	4,5230	6,8877
S	0,0030	0,0056	0,1243	0,1070	0,0116
S²	9,00E-06	3,10E-05	1,54E-02	1,15E-02	1,34E-04
Grubbs 1 (área 1)	0.0000	1,0776	-1,1239	0,6727	-0,4889
Grubbs 2 (área 2)	1,0000	-0,1796	0,7913	-1,1491	1,1504
Grubbs 3 (área 3)	-1,0000	-0,8980	0,3326	0,4765	-0,6615
Grubbs Tabelado	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155
Soma S²	0,0271				
Cochram Calculado	0,5704				
Cochram Tabelado	0,684				

Tabela 20: Pesquisa de valores aberrantes e avaliação da homocedasticidade – dia 2

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Área 1	0,143	0,301	1,48	3,006	4,86
Área 2	0,175	0,293	1,487	3,033	4,856
Área 3	0,143	0,293	1,488	3,024	4,843
Média	0,1590	0,2957	1,4850	3,0195	4,8530
S	0,0226	0,0046	0,0044	0,0191	0,0089
S²	5,12E-04	2,13E-05	1,90E-05	3,64E-04	7,9E-05
Grubbs 1 (área 1)	-0,7071	1,1547	-1,1471	-0,7071	0,7876
Grubbs 2 (área 2)	0,7071	-0,5774	0,4588	0,7071	0,3375
Grubbs 3 (área 3)	-0,7071	-0,5774	0,6882	0,2357	-1,1251
Grubbs Tabelado	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155
Soma S²	9,96E-04				
Cochram Calculado	0,5141				
Cochram Tabelado	0,684				

Tabela 21: Pesquisa de valores aberrantes e avaliação da homocedasticidade – dia 3

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Área 1	0,151	0,286	1,432	2,933	4,71
Área 2	0,15	0,287	1,458	2,928	4,727
Área 3	0,151	0,287	1,455	2,942	4,734
Média	0,1507	0,2867	1,4483	2,9343	4,7237
S	0,0006	0,0006	0,0142	0,0071	1,52E-04
S²	3,33E-07	3,33E-07	2,02E-04	5,03E-05	-1,1073
Grubbs 1 (área 1)	0,5774	-1,1547	-1,1483	-0,1879	0,2701
Grubbs 2 (área 2)	-1,1547	0,57735	0,6796	-0,8927	0,8372
Grubbs 3 (área 3)	0,5774	0,5774	0,4687	1,0806	1,155
Grubbs Tabelado	1,155	1,155	1,155	1,155	
Soma S²	4,06E-04				
Cochram Calculado	0,499				
Cochram Tabelado	0,684				

Os resultados apresentados para a pesquisa de valores aberrantes e avaliação de homocedasticidade do método nas 3 curvas de calibração utilizadas nos estudos de linearidade demonstraram que neste grupo de resultados não há presença de valores aberrantes e que o método é homocedástico. Desta forma o modelo linear se aplica e a curva de calibração pode ser calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Desta forma com as curvas de calibração obtidas pelo método dos mínimos quadrados, foram avaliados o coeficiente de correlação, intercepto e o coeficiente angular das 3 curvas de calibração e os resultados estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22: Resumo dos parâmetros avaliados no estudo de linearidade

	Coefficiente de correlação	Coefficiente angular	Intercepto
Curva 1	0,9999	- 0,0149	0,0296
Curva 2	0,9999	- 0,0151	0,0303
Curva 3	0,9999	-0,0130	0,0444

Com relação ao coeficiente de correlação aos valores obtidos foram considerados satisfatórios, pois quanto mais próximo da unidade melhor é a correlação.

Na avaliação dos valores encontrados para o intercepto, para que o método trabalhe na faixa da linearidade é necessário que o intercepto da curva de calibração esteja localizado entre o intervalo de confiança de 95% da curva traçada, este critério também foi considerado satisfatório.

O coeficiente angular foi avaliado através do teste t. Comparou-se o t obtido pelo programa estatístico (Excel), ou seja, o t experimental, com o t tabelado para n-2 graus de liberdade, para que seja possível considerar o eixo X e o eixo Y. Como os resultados obtidos demonstraram que T tabelado > T experimental, foi possível concluir que o método está trabalhando dentro da faixa de linearidade.

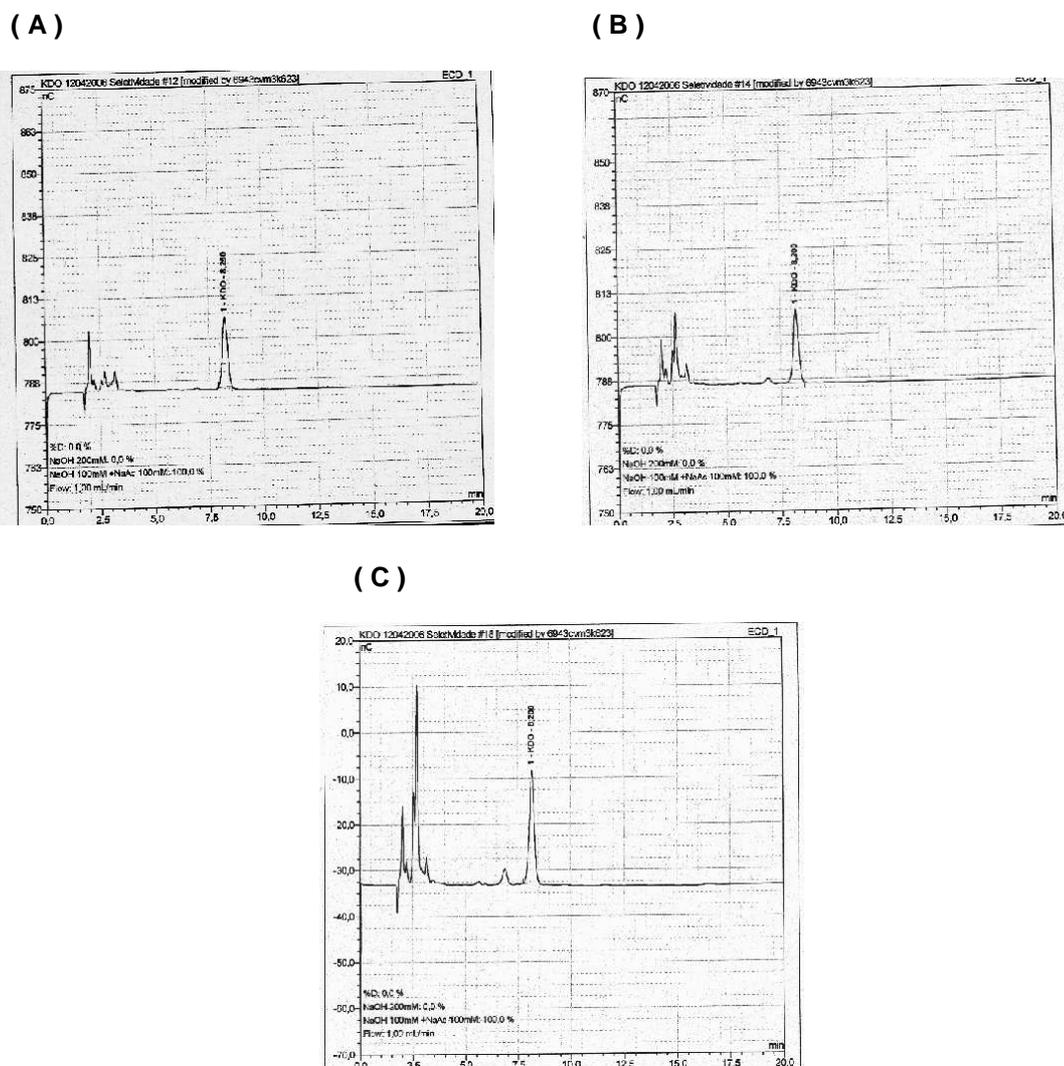
4.7.2 Seletividade

A seletividade analítica representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca a presença da substância em estudo em misturas complexas, sem a interferência de outros componentes da amostra.

Na ausência de substâncias interferentes nas amostras, estas devem apresentar o pico correspondente ao KDO, em tempo de retenção compatível com aquele necessário para a observação do pico do padrão.

Na figura 21 são apresentados os cromatogramas obtidos no estudo de seletividade do método.

Figura 21: Cromatograma obtido no estudo de seletividade. Cromatograma (A), corresponde a adição de 200 μ L de padrão sigma a 200 μ L de solução padrão correspondente a concentração do menor ponto da curva de calibração (ponto 1). Cromatograma (B) Corresponde a adição de 200 μ L de padrão sigma a 200 μ L de solução padrão correspondente ao ponto 3 da curva de calibração. Cromatograma (C) Corresponde a adição de 200 μ L de padrão sigma a 200 μ L de solução padrão correspondente ao ponto 4 da curva de calibração.



Os resultados obtidos no estudo de seletividade demonstraram que o método em questão é seletivo para a dosagem de KDO na matriz empregada e nas condições de análise desenvolvidas. Tal conclusão se baseia no aumento do pico correspondente ao KDO após a adição padrão realizada nos experimentos anteriores e apresentadas na Figura 21.

4.7.3 Precisão

Por definição, pode-se dizer que precisão é o grau de variação de resultados de uma medição. Os estudos de precisão deste trabalho foram realizados pela avaliação da precisão intermediária e da repetitividade. A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra em condições idênticas e a precisão intermediária é a medida do erro aleatório, expressa pela dispersão obtida em uma série de medidas repetidas, realizadas por exemplo, em dias diferentes.

Os resultados obtidos nos estudos de repetitividade estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23: Resumo dos resultados obtidos nos estudos de repetitividade

Área 1	1,479
Área 2	1,503
Área 3	1,471
Área 4	1,478
Área 5	1,458
Média das áreas	1,478
Desvio padrão	0,016
Desvio padrão relativo	1,08 %

Para a avaliação final dos resultados foi utilizado o desvio padrão relativo, que também pode ser chamado de coeficiente de variação ou amplitude. Quanto menor for a amplitude, melhores estão os resultados obtidos para repetitividade. É considerado satisfatório valor de amplitude de até 5%.

Desta forma, os resultados obtidos demonstram que o método apresenta repetitividade satisfatória para as condições e faixa de trabalho empregada, com desvio padrão relativo de 1,08%.

Para a avaliação da precisão intermediária os resultados obtidos estão apresentados na tabela 24. Neste estudo foi variado o dia da análise.

Tabela 24: Resumo dos resultados obtidos nos estudos de precisão intermediária:

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Área 1	1,233	0,910	0,929
Área 2	1,239	0,901	0,927
Área 3	1,237	0,910	0,929
Média das Áreas	1,236	0,907	0,928
Desvio padrão	0,0031	0,0052	0,0012
Variância	$9,33 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-6}$

Média das respostas para os dias 1, 2 e 3 = 1,0236

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Cochran e obteve-se $C_{calculado}$ 0,7168 e $C_{tabelado}$ 0,871, estes resultados demonstraram que os resultados são homocedásticos e os cálculos do desvio padrão foram realizados com a fórmula empregada para o desvio padrão agrupado. O desvio padrão agrupado foi de $1,26 \times 10^{-5}$ e o desvio padrão relativo foi de 0,001%. Sabe-se que quanto menor for a amplitude, melhores estão os resultados obtidos para precisão intermediária. São considerados satisfatórios, valores de amplitude de até 5%.

Os resultados obtidos expressaram as variações dentro de um mesmo laboratório e demonstraram que o método apresenta precisão intermediária satisfatória para as condições e faixa de trabalho empregada, com desvio padrão relativo de 0,001%.

4.7.4 Exatidão

Por definição exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 25. A exatidão foi calculada a partir dos resultados obtidos como o percentual de resposta dado através do ensaio.

Tabela 25: Resumo dos resultados obtidos nos estudos de exatidão

Padrões	Conc. Padrões (µg/mL)	Área Padrões	
P1	4,03	0,097	
P2	7,75	0,169	
P3	39,06	0,819	
P4	79,43	1,852	
P5	125,55	2,886	
Amostra	Conc. Amostra (µg/mL)	Áreas Amostra	
A1	157,059	3,603	
P2 + A1 (1:1)*	Conc. Final (µg/mL)	P2/2_{Real}– (A1/2) (µg/mL)	(P2/2_{Real}/P2/2_{Teórico}) x 100
1	82,089	3,569	92,10%
2	82,318	3,798	98,01%
3	82,129	3,609	93,13%
P4 + A1 (1:1)*	Conc. Final (µg/mL)	P4/2_{Real}– (A1/2) (µg/mL)	(P4/2_{Real}/P4/2_{Teórico}) x 100
1	118,602	40,08	100,00%
2	118,762	40,24	100,40%
3	118,057	39,54	99,56%

* P2/2 = 3,875 µg/mL; P4/2 = 39,71 µg/mL; A1/2 = 78,52 µg/mL

Como o percentual de resposta obtido a partir dos experimentos programados foi maior do que 95%, já que a média de recuperações foi de 97,2 %, o método em questão pode ser considerado exato para o fim pretendido.

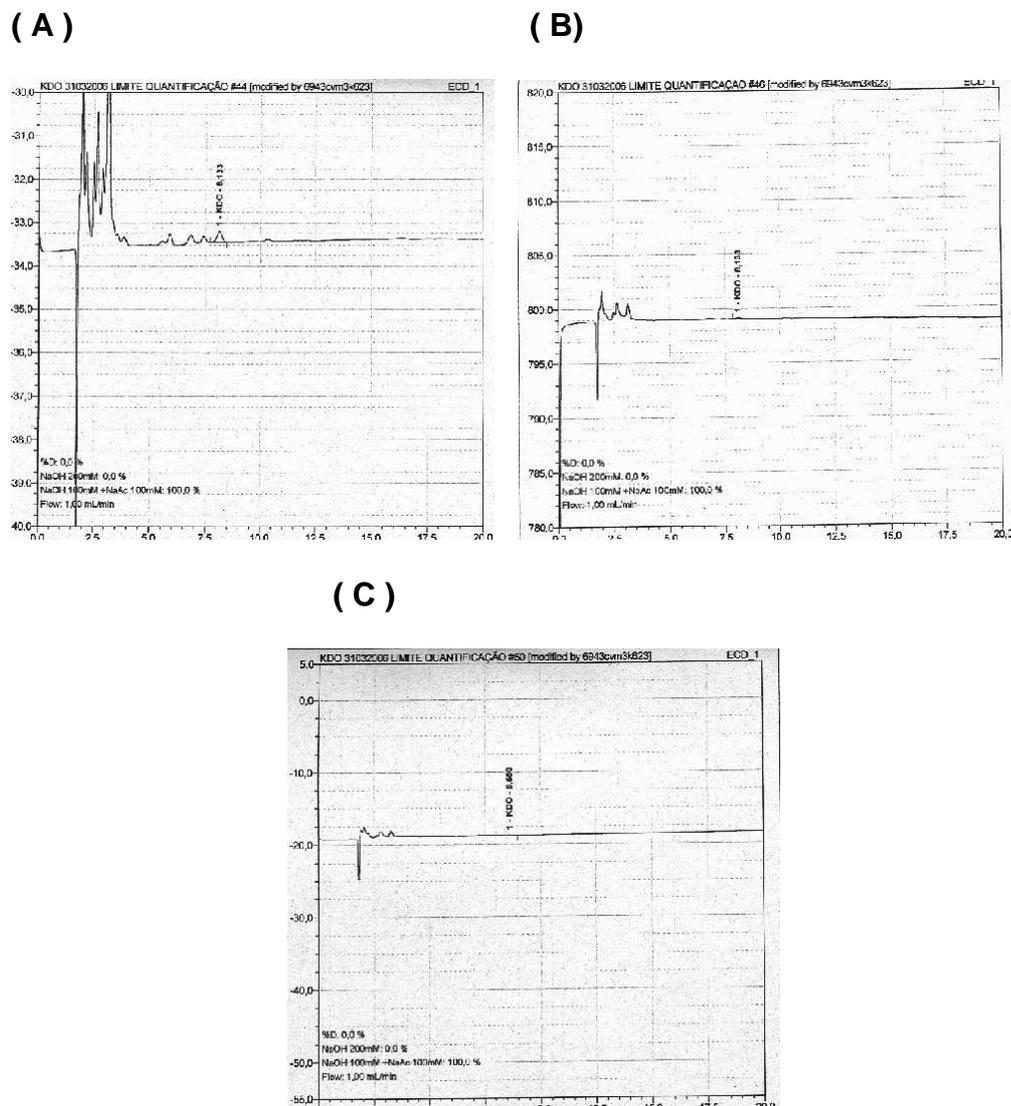
4.7.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção de uma medida é muitas vezes determinado pela análise repetida de uma porção de ensaios de brancos e é a concentração cuja resposta é equivalente a resposta média obtida para os ensaios em branco mais 3 desvios padrão.

O limite de detecção representa a mais baixa concentração do analito a ser pesquisado, que pode ser detectado com certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental.

Os resultados experimentais obtidos para o limite de detecção e quantificação estão apresentados na figura 22.

Figura 22: Cromatogramas limite de quantificação e limite de detecção. Cromatograma (A) corresponde a concentração de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Cromatograma (B) corresponde a concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Cromatograma (C) corresponde a concentração de 0,06 $\mu\text{g/mL}$.



Analisando os cromatogramas obtidos para estudos de limite de detecção e limite de quantificação é possível perceber que experimentalmente, o KDO pode ser detectado a partir de 0,06 $\mu\text{g/mL}$ e que a sua quantificação se torna confiável a partir de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

Além disso, o limite de detecção e quantificação do método foi determinado matematicamente e os valores obtidos foram $\text{LD} = 1,27\mu\text{g/mL}$ e $\text{LQ} = 3,86\mu\text{g/mL}$.

Normalmente, são esperadas variações entre os valores encontrados experimentalmente e os valores estimados a partir de cálculos teóricos. Com o objetivo de trabalhar com uma maior margem de segurança, e com base nos resultados obtidos, limite de detecção considerado para o método foi de $1,27\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação $3,86\mu\text{g/mL}$.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na adequação de algumas metodologias usadas nesta tese experimental visando o controle de qualidade de vacinas antimeningocócicas sorogrupo B possibilitaram um maior entendimento do produto e a possível implementação efetiva destas na rotina de análises a serem realizadas no INCQS.

Ficou constatado que a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas, técnicas analíticas usadas em pesquisas semelhantes às desenvolvidas neste trabalho, se mostraram apropriadas para o uso rotineiro na análise de vacinas baseadas em OMVs.

Assim, os principais antígenos vacinais foram identificados, demonstrando que os métodos empregados constituem uma forte ferramenta para a avaliação da consistência do produto vacinal a base de OMV. Contudo, vale a pena ressaltar que uma limitação do uso do método foi referente à identificação de alguns antígenos de baixo peso molecular. Um aprimoramento do método imunológico, com o uso de antissoros contra os antígenos específicos, é uma perspectiva de aperfeiçoamento desse trabalho.

Nesse estudo também foi implementado o método de análise do LOS, o segundo tipo de antígeno relevante nas vacinas à base de OMV. Esse método se mostrou válido para a determinação do LOS nas preparações vacinais, atendendo aos requisitos metrológicos estabelecidos. Além disso, tais métodos poderiam ser usados futuramente na análise da nova geração de vacinas, com algumas adaptações, vacinas estas, que utilizam um número menor de antígenos recombinantes.

Desta forma, é sugerido, apoiado em nossos resultados experimentais, que os métodos desenvolvidos nesse trabalho poderão servir de base para o estabelecimento de uma monografia para vacinas contra a meningite B na Farmacopéia Brasileira. A normatização desses procedimentos será a base para a implementação de uma rotina de controle de qualidade, na medida em que essas vacinas sejam incorporadas pelo PNI. O uso de métodos com essas características ajudarão a garantir o consumo seguro de produtos que não ofereçam nem danos nem riscos a saúde dos usuários.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABERG, I.S. et al. Combined administration of meningococcal serogroup B outer membrane vaccine and conjugated serogroup C vaccine indicated for prevention of meningococcal disease in safe and immunogenic. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 12, n. 5, p. 599-605, 2005.

ABAD, R. et al. Sequencing of the porB gene: a Step toward a True Characterization of *Neisseria meningitidis*. **Clin. Vaccine Immunol.**, Washington, v. 13, n. 10, p. 1087-91, 2006.

ANDERSEN, S. R. et al. Outer membrane vesicle vaccines made from short-chain lipopolysacchride mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*: effect of the carbohydrate chain length on the immune response. **Vaccine**, Kidlington, v. 15, n. 11, p. 1225-1234, 1997.

BARATA, Rita de Cássia Barradas. *Epidemia de doença meningocócica, 1970/197. Aparecimento e disseminação do processo epidêmico*. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 22, n. 1, p. 16-24, 1988.

BEJUNE, G. et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. **Lancet**, London, v. 338, n. 8775, p. 1093-1096, 1991.

BLUM H.; BEIER H.; GROSS H. J. The best silver stain. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, p. 93–99, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os produtos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 jan. 1977. Seção 1, p.11.

BRASIL. Portaria S.V.S. nº 109, de 4 de novembro de 1993. Delega ao INCQS a responsabilidade sobre a emissão de parecer técnico sobre solicitação de registro e de programa de inspeções sobre boas práticas de fabricação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 nov. 1993, p.16723.

BRAUN, H. A.; KLEIN, V. V. Some problems of pyrogen testing. **Bull. Parenter. Drug Assoc.**, Philadelphia, v. 14, p. 9-13, 1960.

PREVENÇÃO à doença meningocócica e estratégia de controle. São Paulo: CVE, 2004. Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: out. 2007.

BRICKS, L. F. Doenças meningocócicas - morbidade e epidemiologia nos últimos 20 anos: revisão. **Pediatria**, São Paulo, v. 24, n. 3-4, p. 122-131, 2002.

BRUGE, J. et al. Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult male volunteers. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, n. 9-10, p. 1087-1096, 2004.

CALADO, V., MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: Ed. e-papers, 2003. 260 p.

CALLAGHAN, M.J. et al. Potential of recombinant opa proteins as vaccine candidates against hyperinvasive meningococci. **Infect. immun.**, Washington, v. 79, n. 2, p. 2810-2818, 2011.

CAPECCHI, B. et al. The genome revolution vaccine research. **Curr. Issues Mol. Biol.**, Wymondham, v. 6, n. 1, p. 17-27, 2004.

CAROFF, M., KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, n. 23, p. 2431-2447, 2003.

CARVALHANAS, T. R. M. P. Meningites Bacterianas. **Rev. Prática Hospitalar**. São Paulo, ano VII, n. 38, mar./abr. 2005.

CHALABAEV, S. et al. 3-Deoxy-D-manno-octulosonic Acid (Kdo) Hydrolase Identified in *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, and *Legionella pneumophila*. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 45, p. 34330-34336, 2010.

CLAASEN, I.; MEYLIS, J.; VAN DER LEY, P. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 14, n. 10, p. 1001-1008, 1996.

COBB, B. A.; WANG, Q.; TZIANABOS, A. O. Polysaccharide processing and presentation by MHCII pathway. **Cell**, Cambridge, v. 117, n. 5, p. 677-687, 2004.

COTTER, R. J. **Time-of-flight mass spectrometry**: Instrumentation and applications in biological research. Washington: American Chemical Society, 1997. 326p. (ACS Professional Reference Books).

COTTER, R. J.; GRIFFITH, W.; JELINEK, C. Tandem time of flight (TOF/TOF) mass spectrometry and the curved-field reflectron. **J. chromatogr. B, Analyt. technol. biomed. life sci.**, Amsterdam, v. 855, n. 1, p. 2-13, 2007.

CRAVEN, D. E.; SHEN, K. T.; FRASCH, C. E. Natural bactericidal activity of human serum against *Neisseria meningitidis* isolates of different serogroups and serotypes. **Infect. Immun.**, Washington, v. 37, n. 1, p. 132-137, 1982.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.

DA PONTE, F.C. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciências e saúde**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 619-653, 2003. Suplemento 2.

DANIELSON, L.; MANN, E. The history of a singular and very mortal disease, which lately made its appearance in Medfield. In. ADAMS, Daniel. **Medical and Agricultural Register**. Boston: [s.n.], v. 1, 1806, p. 65-69.

DAVID, S. S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, Washington, v. 27, p. B71–B77, 2009. Suplemento 2.

DE FILIPPIS, I. et al. PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. **Infect. Immun.**, Washington, v. 75, n. 7, p. 3683-3685, 2007.

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. 2005. 133 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

DE MORAES, J. C.; PERKINS, B. A.; CAMARGO, M. C. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brasil. **Lancet**, London, v. 340, n. 8827, p. 1074-1074, 1992.

ELLIS, R. W.; GRANOFF, B. M. **Development and clinical use of Haemophilus b conjugate vaccine**. New York: Mercel Dekker, 1994. 498 p.

QUANTIFYING uncertainty in analytical measurement. 2. ed. London: EURACHEM/CITAC, 2000. 126 p. (EURACHEM/CITAC guide CG4).

THE UNITED States Pharmacopeia 34. National Formulary 29: 2011. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2010. v. 1.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 1, p. 1353-1372.

EUROPEAN pharmacopoeia. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011. v. 1, p. 776-779; 802-805.

FRASCH, C. E.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.7, n. 4, p. 504-510, 1985.

FRASCH, C. E. Meningococcal vaccines: past, present and future. In: Cartwright, K. (Ed.). **Meningococcal disease**. Chichester: J Wiley, 1995. p. 260-283.

FRASCH, C. E. et al. Antibody response in adults to an aluminum hydroxide adsorbed *Neisseria Meningitidis* serotype 2b protein group B-polysaccharide vaccine. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 158, n. 4, p. 710-718, 1988.

FREDLUND, H. Serum factors and polymorphonuclear leucocytes in human host defence against *Neisseria meningitidis*. Studies of interactions with special reference to a chemiluminometric technique. **Scandinavian journal of infectious diseases . Supplementum**, Stockholm, v.87, p. 1–72, 1993.

GHARAHDAHGI, F. et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, n. 3, p. 601-605, 1999.

GIRARD, M. P. et al. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, n. 50, p. 5708-5724, 2005.

GIRARD, M. P.; PREZIOSI, M. P.; AGUADO, M. T. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, n. 22, p. 4692-4700, 2006.

GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y. Human immunity to the meningococcus: III. Preparation and immunichemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. **J. Exp Med.** v. 129, n. 6, p. 1349-1365, 1969.

GRECO, M. The future of vaccines: an industrial perspective. **Vaccine**, Kidlington, v. 20, p. s101-s103, 2002. Suplemento 1.

GRIFFISS, J.M. et al. Meningococcal molecular mimicry end the search for an ideal vaccine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 85, p. 32-36, 1991. Suplemento 1.

HARRISON, L. H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 19, n. 1, p. 142-164, 2006.

HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteome profiling-pitfalls and progress. **Yeast**, Davis, v. 17, p. 81-87, 2000.

HEBERT, B. Advances in protein solubilisation for two dimensional eletrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, p. 660-663, 1999.

HENNINGSEN, R. et al. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for twodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, p. 1479-1488, 2002.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. Rev. 03. Rio de Janeiro, 2010. 20 p.

IVERSSON, O. C. Aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no município de São Paulo (Brasil) no período de 1968 a 1974. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 10, p. 1-16, 1976.

JACOBSSON, S.; MOLLING, P.; OCLÉN, P. Seroprevalence of antibodies against fHbp and NadA, two potential vaccine antigens *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, 27, 5755-5759, 2009.

JESSOURON, E., SILVEIRA, I.F.B., LARNJEIRA, A. P., 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**, Kidlington, v. 22, p. 2617-2625, 2004.

JUNGBLUT, P.R. et al. Peptide Mass Fingerprinting. **Methods**, San Diego, v. 35, n. 3, p. 237-247, 2005.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KIANG, J. et al. Determination of 2-Keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO) with high performance anion exchange chromatography(HPAEC): Survey of stability of KDO and optimal hydrolytic conditions. **Anal. Biochem.**, New York, v. 245, n. 1, p. 97-101, 1997.

LANNETE, E. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985.

LEAMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LIMA, F. A. F. **Dessorção induzida por laser em insulina, carbono e haletos alcalinos**. 2006. 114 f. Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física. Rio de Janeiro, 2006.

LIN, H.H. et al. Performance characteristics of the limulus amebocyte lysate assay and gas chromatography-mass spectrum analysis of lipopolysaccharides

relative to nitric oxide production by peritoneal exudates of cells. **J. Hazard. Mater.**, Amsterdam, v. 145, n. 3, p. 431-436, 2007.

LOW, T. Y.; SEOW, T. K.; CHUNG, M. C. M. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, Weinheim v. 2, p. 1229-1239, 2002.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANN, M. et al. Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix made by fast evaporation. **Anal. Chem.**, Washington, v. 66, p. 3281-3287, 1994.

MILAGRES, L. G. et al. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane vaccine: Comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, n. 10, p. 4419-4424, 1994.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for analytical chemistry**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1984.

MORAN, E. E.; BRANDT, B. L.; ZOLLINGER, W. D. Expression of the L8 lipopolysaccharide determinant increase the sensitivity of *Neisseria meningitidis* to serum bactericidal activity. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, n. 10, p. 5290-5295, 1994.

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

MUNFORD, R. S.; HALL, C. L.; GRIMM, L. Detection free endotoxin in cerebrospinal fluid by *Limulus* lysate test. **Infect. Immun.**, Washington, v. 45, p. 531-533, 1984.

NORONHA, C. P.; STRUCHINER, C. J.; HALLORAN, M. E. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brasil: a case-control study. **Int. J. Epidemiol.**, London, v. 24, n. 5, p. 1050-1057, 1995.

OLIVER, K; WELSCH, J. A.; GRANOFF, D. M. Improved immunogenicity of a H44/76 group B outer membrane vesicle vaccine with over-expressed genome-derived nesserial antigen 180. **Vaccine**, Kidlington, v. 25, p. 19121-1920, 2007.

PARKER, K.C. et al. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 1920-1932, 1998.

PELTOLA, H. Meningococcal vaccines: current status and future possibilities. **Drugs**, New York, v.55, n. 3, p. 347-356, 1998.

PENG, J. et al. Characterization of ST-4821 complex, a unique *Neisseria meningitidis* clone. **Genomics**, San Diego, v. 91, n. 1, p. 78-87, 2008.

PETERSON, G.L. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr, and randall. **Anal. Biochem.**, New York, v. 100, p. 201-220, 1979.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidate against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, Washington, v. 287, n. 5459, p. 1816-1820, 2000.

POOLMAN, J.T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect Agents. Dis.**, New York, v.4, n. 1, p. 13-28, 1995.

RABILLOUD, T. et al. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, p. 307-316, 1997.

RAMSAY, M. E. et al. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. **Lancet**, London, v. 357, n. 9251, p. 195-196, 2001.

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

RAPPUOLI, R.; MILLER, H. I.; FALKOW, S. Medicine. The intangible value of vaccination science. **Science**, Washington, v. 297, n. 5583, p. 937-939, 2002.

RECOMMENDATIONS to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines. Geneva: WHO Press, 2006. 79 p. (WHO/BS/06.2041).

REQUEJO, Henry I. Z. *Comportamento imunológico das vacinas anti-meningocócicas*. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 31, n. 4, p. 402-416, 1997.

ROBBINS, J. R.; SCHNEERSON, R. Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.161, p. 821-823, 1990.

RODRIGUEZ, A. P. et al. The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 433-440, 1999.

RUSESELL, J. E. et al. PorA Variable Regions of *Neisseria meningitidis*. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 10, n. 4, p. 674-678, 2004.

SANBORN, W.R. Development of meningococcal vaccines. In: VEDROS, N. A. (Ed.). **Evolução da doença meningocócica**. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 121-134.

SANDERS, H.; FEAVERS, I. M. Adjuvant properties of meningococcal outer membrane vesicles and the use of adjuvants in *Neisseria meningitidis* protein vaccines. **Expert Rev. Vaccines**, London, v. 10, n. 3, p. 323-334, 2011.

SANTONI, V. et al. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 3329-3344, 2000.

SANTONI, V. et al. Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, p. 705-711, 1999.

SCARSELLI, E. et al. Epitope mapping of bactericidal Monoclonal antibody against the factor H binding protein of *Neisseria meningitidis*. **J. Mol. Biol.**, London, v. 386, p. 97-108, 2009.

SCHUCK, S. Resistance of cell membranes to different detergents. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 100, n. 10, p. 5795-5800, 2003.

SERRUTO, D. et al. Biotechnology and vaccines: application of functional genomics to *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 113, p. 15-32, 2004.

SHEVCHENKO, W.; VORM, O.; MANN, M. Mass Spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamide gels. **Anal. Chem.**, Washington, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.

SIERRA, G.V. et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. **NIPH Ann. Dis.**, Oslo, v. 14, n. 2, p. 195-210, 1991.

SKINER, H.A. **The original of medical terms**. 2. ed. New York: Hafner Publishing Co., 1970. 438 p.

SONESSON, A. et al. Comparison of the *Limulus* amoebocyte lysate test and gas chromatography-mass spectrometry for measuring lipopolysaccharide

(endotoxin) in airborne dust from poultry-processing industries. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1271-1278, 1990.

STEPHENS, D.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *neisseria meningitidis*. **Lancet**, London, v.369, n. 9580, p. 2196-2210, 2007.

STUART, J. M. et al. An outbreak of meningococcal disease in Stonehouse: planning and execution of a large scale survey. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.99, p.579-589, 1987.

SUNG, J. W. et al. Biochemical characterizations of Escherichia coli-expressed protective antigen Ag473 of Neisseria meningitides group B. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, p. 8175-8182, 2010.

TAPPERO, J. W., et al. Immunogenicity of serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. **JAMA**, Chicago, v. 281, n. 16, p. 1520-1527, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TSAI, S. Y. et al. Transcription factors from oviduct and HeLa cells are similar. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 256, n. 24, p. 13055-13059, 1981.

TSOLAKOS, N. et al. Characterization of meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines from strain 44/76 after growth in different media. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, p. 3211-3218, 2010.

URWIN, R. et al. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococcal: implications for vaccine design. **Infect. Immun.**, Washington, v. 72, n. 10, p. 5955-5962, 2004.

VAISAR, T. Thematic review series: proteomics. Proteomic analysis of lipid-protein complexes. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v. 50, n. 5, p. 781-786, 2009.

VAN DER LEY, P. et al. Topology of Outer Membrane Porins in Pathogenic *Neisseria* spp. **Infect. Immun.**, Washington, v. 59, n. 9, p. 2963-2971, 1991.

VERMONT, C. L. et al. PorA- specific differences in antibody avidity after vaccination with a hexavalent men B outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, p. 3008-3013, 2004.

VIEUSSEUX, M. Mémoire su la maladie qui a regné a Genève au printemps de 1804. **J Med Chir Pharmacol**, Bruxelles, v.11, p. 163, 1805.

VIPOND, C. et al. Characterization of Protein Content of a Meningococcal Outer Membrane Vesicle Vaccine by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Human Vaccines**, Georgetown, v. 1, n. 2, p. 80-84, 2005.

VIPOND, C. et al. Proteomic analysis of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from the group B strain NZ98/254. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 3400-3413, 2006.

WEICHSELBAUM, A. Ueber die aetiologie der akuten meningitidis cerebropinalis. **Fortschr. Med.**, Munchen, v. 5, p. 573-583, 1887.

WEISS, D., COPLAN, P., GUESS, H. Epidemiology of bacterial meningitidis among children in Brazil, 1997-1998. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 35 n. 3, p. 249-255, 2001.

WILDER-SMITH, A. Meningococcal disease: risk for international travellers and vaccine strategies. **Travel Med Infect Dis**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 182–186, 2008.

ZOLLINGER, W. D.; MORAN, E. E. Meningococcal vaccines: present and future. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.85, 37-43, 1991. Suplemento 1.

ZOLLINGER, W. D. et al. Complex of meningococcal group b polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 63