

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Doenças Infecciosas e Parasitárias

AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE VACINAS CONTRA *Neisseria meningitidis* SOROGRUPOS B E C EM DESENVOLVIMENTO NO BRASIL

DENISE DA SILVA GOMES PEREIRA

Rio de Janeiro

2016



**AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE VACINAS CONTRA
Neisseria meningitidis SOROGRUPOS B E C EM
DESENVOLVIMENTO NO BRASIL**

DENISE DA SILVA GOMES PEREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Doenças Infecciosas e Parasitárias)

Orientação: Profa. Lúcia Martins Teixeira

Dra. Ellen Jessouroun

Rio de Janeiro

2016

Pereira, Denise da Silva Gomes

Avaliação da combinação de vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em desenvolvimento no Brasil. / Denise da Silva Gomes Pereira. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2016. xvii, 128f. : il.28 ; 31 cm.

Orientadores: Lúcia Martins Teixeira e Ellen Jessouroun. Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina – Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2016.

Referências Bibliográficas: f. 100-115

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Vacina meningocócica B. 3. Vacina meningocócica C conjugada. 4. Vacina combinada 5. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Tese.

I. Teixeira, Lucia Martins. II. Jessouroun, Ellen. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina –Doenças Infecciosas e Parasitárias. IV. Título.

AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE VACINAS CONTRA *Neisseria meningitidis* SOROGRUPOS B E C EM DESENVOLVIMENTO NO BRASIL

Denise da Silva Gomes Pereira

Orientação: Profa. Lúcia Martins Teixeira

Dra. Ellen Jessouroun

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Aprovada em:

Prof. Dr. José Mauro Peralta, PhD, Prof. Titular, UFRJ

Dr. Akira Homma, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ

Dr. André Reinaldo Santos Périssé, PhD, ENSP, FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cleber e Marcia, meu porto seguro;
aos meus irmãos queridos, Viviane e Miguel e a minha sobrinha
Beatriz.

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar a minha vida e permitir mais esta conquista;

Aos meus pais, Cleber e Márcia que além do incentivo me acompanharam cada etapa da minha vida acadêmica, aos meus irmãos, Viviane e Miguel, pelo apoio e incentivo à ultrapassar cada etapa do mestrado;

A Fundação Oswaldo Cruz, representada pelo seu atual Presidente Dr. Paulo Gadelha;

A Bio-manguinhos, representada pelo seu atual Diretor Artur Roberto Couto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, representado pela atual coordenadora Profa. Dr^a Cristina Barroso Hofer

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bacteriana pelo companheirismo e alegrias;

As minhas chefes, Dr^a Maria de Lourdes M. Leal e Dr^a Ivna Alana B. da Silveira, por todo apoio para o desenvolvimento desse trabalho;

A minha orientadora Dr^a Ellen Jessouroun, pela orientação, conselhos, estímulo constante para minha vida profissional e por ter me concedido confiança para realização desse trabalho;

A Prof^a. Dr. Lucia Martins Teixeira por sua orientação e sugestões para a melhoria do trabalho e pela oportunidade de contar com sua experiência científica;

Aos Profs. Dr. José Mauro Peralta e Dr. Allan Guimarães, pela orientação dos ensaios de isotipos de ELISA;

Ao LAEAN por todo apoio e disponibilidade para a realização dos ensaios em animais;

A Equipe OTreino por me proporcionar válvulas de escape, como nadar com o nascer do Sol, pedalar ainda no escuro e correr pelas montanhas do Rio de Janeiro, nos momentos de estresse com os estudos e me dando força para seguir;

A minha família e amigos, por entenderem os constantes momentos de ausência e que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho;

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

OBRIGADA!

“Com exceção da água potável, nenhuma outra modalidade, nem mesmo antibióticos, teve tanto efeito na redução da mortalidade e crescimento da população como as vacinas.”

Plotkin & Plotkin

RESUMO

PEREIRA, Denise da S. G. Avaliação da combinação de vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em desenvolvimento no Brasil. Dissertação de mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A doença meningocócica é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, apresentando variações de acordo com diferentes áreas geográficas. A proteção vacinal contra a doença meningocócica é relacionada à indução da produção de anticorpos com atividade bactericida e sua persistência ao longo do tempo. Atualmente, a combinação de vacinas é uma estratégia importante para a prevenção da doença meningocócica assim como para outras infecções. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da combinação de duas vacinas meningocócicas de formulação nacional, a vacina anti sorogrupo C conjugada, com a vacina contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*, na indução da resposta imune em camundongos. Os parâmetros avaliados incluíram: a atividade bactericida, a especificidade e a persistência dos anticorpos, frente a diferentes cepas brasileiras pertencentes aos dois sorogrupos e desafio bacteriano. Camundongos foram imunizados por via intramuscular com vacina meningocócica C conjugada, vacina meningocócica B e a combinação das duas. Os animais receberam 1/10 da dose humana num esquema de imunização de três doses em intervalos de 15 dias e dose reforço trinta dias após a terceira dose de primo-vacinação. O sangue dos animais foi obtido pela via do plexo orbital, antes da administração de cada dose e após a dose reforço. A atividade bactericida dos anticorpos foi avaliada frente a cepas homólogas e heterólogas às vacinais para os sorogrupos B e C. Para as vacinas teste a resposta bactericida foi maior para a cepa N44/89 (sorogrupo B) do que para cepa N603/95 (sorogrupo B) se equivalendo após a dose reforço. Foi observada a tendência de aumento de resposta bactericida para a vacinacombinada. Após a dose de reforço, observou-se aumento de título dessa resposta para a cepa 2625 (sorogrupo B). Para as vacinas C conjugada monovalente ou combinada após imunização primária observou-se alto potencial de proteção para a cepa C11 sem variação após a 3ª dose e a dose reforço. Para todas as vacinas teste avaliou-se a indução de IgG total, isotipos de IgG e a avidéz destes anticorpos, por ELISA. Os títulos de IgG total para os antígenos da vacina B não mostraram valores significativamente diferentes entre as vacinas monovalentes enquanto foram mais elevados para as vacinas combinadas no esquema de imunização adotado. O mesmo foi constatado em relação a avidéz, com privilégio para a combinação das vacinas. Para o polissacarídeo C, a combinação das duas vacinas, levou a obtenção de valores significativamente maiores do que os obtidos para a vacina monovalente. A análise de isotipos de IgG induzidos pela combinação de vacinas revelou concentrações mais elevadas de anticorpos fixadores de complemento aumentando a resposta Th1. Os resultados indicam a vantagem da combinação das duas vacinas avaliadas, com relação aos títulos de anticorpos induzidos, à sua especificidade e à maior persistência de anticorpos, e proteção em torno de 80% para principal cepa circulante de meningococo sorogrupo B. Tais observações sugerem que a combinação de vacinas avaliadas no presente estudo pode melhorar a imunidade induzida pelas vacinas monovalentes, contribuindo com mais uma evidência de que o uso de vacinas multivalentes pode representar uma interessante estratégia de prevenção.

Palavras chaves: *Neisseria meningitidis*, vacina meningocócica B, vacina meningocócica C conjugada, vacina combinada

ABSTRACT

PEREIRA, Denise da S. G. Avaliação da combinação de vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em desenvolvimento no Brasil. Dissertação de mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Meningococcal disease is an important public health problem worldwide, with variations according to the different geographical areas. Vaccine protection against meningococcal disease correlates with the induction of antibodies with bactericidal activity and their persistence over time. Nowadays, the combination of vaccines is an important strategy for preventing meningococcal disease as well as other infections. This study aimed to evaluate the effect of a combination of two meningococcal vaccine formulated in Brazil, comprising serogroup C conjugate vaccine and a vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis*, in the induction of immune response in mice. Bactericidal activity, specificity and persistence of antibodies were evaluated by using a diversity of Brazilian strains of both serogroups and challenge. Mice were immunized intramuscularly with meningococcal C conjugate vaccine, meningococcal B vaccine and the combination of both. The animals received 1/10 of the human dose in a three-dose immunization schedule at intervals of 15 days, and a booster dose thirty days after the third dose of primo-vaccination. The animals were bled by orbital plexus before each dose and after the booster dose. The bactericidal activity of the antibodies was evaluated against homologous and heterologous strains to vaccine for serogroup C. For serogroup B and vaccines test the bactericidal response was higher for strain N44 / 89 than for strain N603 / 95, although it was equivalent after the booster dose. There was a tendency of increasing bactericidal response in combined vaccines. After the booster dose, increasing titles were for strain 2625. For the C conjugate vaccines, both monovalent or combined, a high potential protection was observed for the C11 strain after primary immunization, and remained unchanged after the 3rd and booster doses. For all test vaccines, titles of total IgG induced, as well as IgG isotypes and the avidity of these antibodies were evaluated by ELISA. Total IgG titers for B vaccine antigens did not show significantly different values among monovalent vaccines, but were higher for the combined vaccines proposed in this study. A similar observation was obtained for avidity testing. Avidity testing also indicated improvements resulting from the combination of vaccines. For the C-polysaccharide, combination of two vaccines showed significantly higher values than monovalent vaccine. Determination of IgG isotypes induced by the combination of vaccines revealed higher concentrations of complement fixing antibodies that increase the Th1 response. Overall, the results suggest advantages for the use of combined vaccines B and C tested, illustrated by increasing in the titles of antibodies induced and their specificity and persistence and protection above 80% main strain meningococcal serogroup B. Such observations suggest that the combination of vaccines evaluated in the present can improve immune response, contributing with additional evidence on the use of multivalent vaccines as a robust strategy for prevention.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, meningococcal B vaccine, meningococcal conjugate C vaccine, combined vaccine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	8
2.1	OBJETIVO GERAL	8
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3	REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1	PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA MENINGOCÓCICA	9
3.1.1	<i>No mundo</i>	9
3.1.2	<i>No Brasil</i>	12
3.2	O AGENTE ETIOLÓGICO	14
3.3	FATORES DE VIRULÊNCIA	16
3.3.1	<i>Cápsula polissacarídica</i>	16
3.3.2	<i>Pili do tipo IV</i>	17
3.3.3	<i>Proteínas de membrana externa</i>	19
3.3.4	<i>Lipo-oligossacarideo</i>	22
3.4	RESPOSTA IMUNE AO MENINGOCOCO	25
3.5	VACINAS CONTRA O MENINGOCOCO	27
3.5.1	<i>Vacinas contra os sorogrupos A, C, W e Y</i>	27
3.5.2	<i>Vacinas contra o sorogrupo B</i>	29
3.6	VACINA MENINGOCÓCICA B BRASILEIRA	33
3.7	VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA BRASILEIRA	35
3.8	VACINAS COMBINADAS	36
3.9	ORIGEM E IMPORTÂNCIA DE BIO-MANGUINHOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	ANTÍGENOS VACINAIS	41
4.1.1	<i>Obtenção das VMEs</i>	41
4.1.2	<i>Obtenção e destoxificação do LOS</i>	42
4.2	VACINA MENINGOCÓCICA B	43
4.3	VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA	44
4.4	VACINAS EXPERIMENTAIS	45
4.5	ENSAIOS EM ANIMAIS	47
4.6	ENSAIO DE ATIVIDADE BACTERICIDA DOS ANTICORPOS	48

4.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	50
4.7.1 <i>Elisa para detecção de anticorpos anti-VME de N. meningitidis grupo B</i>	50
4.7.2 <i>Elisa para detecção de anticorpo contra o polissacarídeo de N. meningitidis grupo C</i>	51
4.7.3 <i>Índice de avidéz</i>	52
4.7.4 <i>Determinação dos isotipos de IgG</i>	53
4.8 ENSAIO DESAFIO	53
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	55
5.1 OBSERVAÇÃO DA CINÉTICA DA RESPOSTA HUMORAL INDUZIDA PELA PREPARAÇÃO TESTE COMPOSTA DA COMBINAÇÃO DAS VACINAS B E C CONJUGADA	55
5.1.1 <i>Quantificação de anticorpos IgG total para VMEs e PSC pelo método de ELISA</i>	55
5.1.2 <i>Índice de avidéz</i>	57
5.1.3 <i>Atividade bactericida dos anticorpos induzidos frente a cepas vacinais e heterólogas</i>	59
5.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL INDUZIDA PELAS VACINAS MONOVALENTES E BIVALENTES COM 3 DOSES DE PRIMO VACINAÇÃO E UMA DOSE REFORÇO	61
5.2.1 <i>Quantificação de anticorpos IgG total para VMEs e PSC pelo método de ELISA</i>	61
5.2.2 <i>Determinação dos isotipo IgG</i>	64
5.2.3 <i>Índice de avidéz</i>	71
5.2.4 <i>Atividade bactericida dos anticorpos induzidos frente a cepas vacinais e heterólogas</i>	73
5.3 ENSAIO DESAFIO	76
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	94
8 REFERÊNCIAS	96

LISTA DE ABREVIATURAS

4CMenB	Quatro componentes contra o meningococo B - Bexsero®
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
AlPO ₄	Fosfato de alumínio
CAMPs	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
CD14	Cluster de Diferenciação 14
CEP	Conselho de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFR	<i>Case-fatality rates</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
crgA	<i>Contact-regulated gene A</i>
DL50	Dose letal 50%
dLOS	LOS destoxificado
DM	Doença Meningocócica
DO	Densidade Ótica
DOC	Desoxicolato de sódio
DT	Difteria e Tétano
DTP	Vacina tríplice contra Difteria, Tetano e Pertussis (coqueluche)
EDAC	Etileno diamino carbodimida
EDDHA	<i>Ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic acid</i> (Ácido etileno diamino)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
EU/mL	<i>Elisa Units per millititer</i> (Unidades de Elisa por mililitro)
Fe ⁺³	Íon férrico
FetA	Proteína de membrana reguladora de ferro (ou FrpB)
fHBP	Proteína ligante do fator H
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GSK	Glaxo Smith Kline
IA	Índice de Aidez
IRPs	Proteínas reguladas pelo ferro
kDa	KiloDalton
K _L a	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
LAEAN	Laboratório de Experimentação Animal

Ln	Logarítmo neperiano
LOS	Lipo-oligossacarídeo
MAbs	<i>Monoclonal Antibodies</i> (Anticorpos monoclonais)
MD-2	Fator 2 de diferenciação mielóide
MPL	Monofosforil-lípido A
NaCl	Cloreto de sódio
NadA	<i>Neisserial adhesin A</i>
NHBA	<i>Neisserial Heparin-Binding protein</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMT	Proteína monomérica tetânica
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PorA	Proteína de membrana A
PorB	Proteína de membrana B
PSC	Polissacarídeo do grupo C
PSC-oxi	Polissacarídeo oxidado
SBA	<i>Serum bactericidal activity</i> (Atividade bactericida do soro)
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SFB	Soro fetal bovino
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SNC	Sistema nervoso central
TBS-SFB	Tampão Tris adicionado de soro fetal bovino
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TT	Toxóide tetânico
TTH	Toxóide tetânico com hidrazina
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i> (Fundo das Nações Unidas para a Infância)
VME	Vesícula de membrana externa

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distribuição do número de isolados de <i>Neisseria meningitidis</i> por faixa etária no Brasil	5
Gráfico 2 Anticorpos IgG total anti-PSC induzidos pela vacina combinada meningocócica B e C conjugada	57
Gráfico 3 Índice de avidéz de anticorpos IgG para VMEs das duas cepas vacinais induzidos pela vacina combinada meningocócica B e C conjugada em camundongos	58
Gráfico 4 Índice de avidéz de anticorpos IgG para PSC induzidos pela vacina combinada meningocócica B e C conjugada em camundongos	59
Gráfico 5 IgG total para VME da cepa N44/89 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a vacina C conjugada líquida e combinada a vacina C conjugada liofilizada.....	62
Gráfico 6 IgG total para VME da cepa N603/95 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a vacina C conjugada líquida e combinada a vacina C conjugada liofilizada.....	62
Gráfico 7 Quantificação dos níveis de IgG total anti-PSC em soros de camundongos imunizados com as vacinas C conjugadas líquida e liofilizada monovalentes e combinadas a vacina meningocócica B.	63
Gráfico 8 Concentração dos isotipos de IgG contra VME N44/89.....	67
Gráfico 9 Concentração dos isotipos de IgG contra VME N603/95.....	68
Gráfico 10 Concentração dos isotipos de IgG contra PSC.....	70
Gráfico 11 Índice de avidéz de IgG para VMEs da cepa N44/89 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a C Conjugada líquida e C conjugada liofilizada.....	71
Gráfico 12 Índice de avidéz de IgG para VMEs da cepa N603/95 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a C Conjugada líquida e C conjugada liofilizada.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição dos sorogrupos de <i>Neisseria meningitidis</i> causadores de Doença Meningocócica no mundo.....	10
Figura 2 Distribuição do risco de doença meningocócica nos países africanos com evidência da zona designada por Cinturão Africano da Meningite.....	11
Figura 3 Distribuição dos principais sorogrupos de <i>Neisseria meningitidis</i> no Brasil, por região.	13
Figura 4 Representação esquemática da parede celular de <i>Neisseria meningitidis</i> .	15
Figura 5 Observação, em microscopia eletrônica, de células epiteliais infectadas com <i>Neisseria meningitidis</i>	18
Figura 6 Representação esquemática de lipo-oligossacarídeos de <i>Neisseria meningitidis</i>	23
Figura 7 Histórico das vacinas meningocócicas.....	33
Figura 8 Fluxograma de atividades.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Formulações vacinais utilizadas no segundo bloco de experimentos.....	48
Tabela 2 Concentração de anticorpos (IgG total) anti-VMEs em camundongos imunizados com a vacina meningocócica combinada C conjugada e B	56
Tabela 3 Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados, com vacina combinada B com C conjugada por via intramuscular, com 3 doses (T0, T15, T30).....	60
Tabela 4 Quantificação de isotipos de IgG total em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócicas.....	65
Tabela 5 Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados, por via intramuscular, com as vacinas meningocócica B e monovalentes C conjugadas líquida e liofilizada.	75
Tabela 6 Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados, por via intramuscular, com as vacinas combinadas meningocócica B e C conjugadas líquida e liofilizada.....	76

Tabela 7 Proteção de camundongos vacinados com 3 doses de vacinas teste em imunização primária e uma dose reforço, e desafiados com diferentes suspensões bacterianas. Para todas as cepas desafio utilizou-se 1 DL50% e os animais foram observados 72 horas.....	77
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de <i>Neisseria meningitidis</i>	17
Quadro 2 Principais proteínas de classe da membrana externa da <i>Neisseria meningitidis</i> e suas características.....	20

1 INTRODUÇÃO

O termo doença meningocócica (DM) é utilizado para referir as diferentes síndromes infecciosas agudas, muitas vezes fatais, causadas por bactérias pertencentes à espécie *Neisseria meningitidis*, também conhecidas como meningococos. Entre as manifestações clínicas mais graves causadas por esses microrganismos está a meningite, que corresponde à infecção das membranas que revestem o sistema nervoso central, e que pode ser acompanhada de infecção generalizada (meningococemia). A doença tem sua maior incidência em crianças, podendo, no entanto, ocorrer em adultos jovens e também em idosos. Existem 12 sorogrupos identificados de *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, W, X, Y, Z e 29E), sendo seis os mais freqüentemente causadores de doença: A, B, C, Y, W e X. Ultimamente, o sorogrupo X tem surgido, em algumas regiões do mundo, como emergente causador de DM (Stephens, 2009; Sáfyadi *et al.*, 2012, Pizza & Rappuoli, 2015).

O ser humano é o único hospedeiro natural de *N. meningitidis*. Cerca de 5 a 10% dos adolescentes e adultos são portadores assintomáticos da bactéria na orofaringe, podendo transmitir a bactéria, mesmo sem desenvolver a doença. O estado de portador assintomático pode chegar a 40% em situações de epidemia. A bactéria é transmitida de uma pessoa para outra pelas secreções respiratórias (gotículas de saliva, espirro, tosse). Geralmente, após a transmissão, a bactéria permanece no trato respiratório superior (naso e orofaringe) do indivíduo receptor por curto período e acaba sendo eliminada pelos próprios mecanismos de defesa do organismo. Desta forma, a condição de portador assintomático tende a ser transitória, embora possa se estender por períodos prolongados de meses a até mais de um ano.

Em menos de 1% dos indivíduos infectados, contudo, a bactéria consegue penetrar na mucosa respiratória e atinge a corrente sanguínea levando ao aparecimento da DM. A disseminação a partir da nasofaringe pode dar origem a infecções sistêmicas que podem culminar em falência múltipla dos órgãos, septicemia fulminante com choque séptico, coagulação sistêmica e morte. A invasão geralmente ocorre nos primeiros cinco dias após o contágio. Para que a infecção

evolua para septicemia e formas mais graves da doença meningocócica, é necessário que o microrganismo sobreviva e se multiplique na corrente sanguínea. No entanto, os fatores que determinam o aparecimento de doença invasiva ainda não são totalmente esclarecidos (Dwilow & Fanella, 2015).

Algumas cepas de meningococos, associadas ou não a altas taxas de transmissão, raramente causam doença e são isoladas normalmente de portadores assintomáticos. Outras cepas, particularmente quando recém-introduzidas na população, embora possam ser pouco transmissíveis, estão associadas a altas taxas de infecção após o contato com a nasofaringe (Jones *et al.*, 1998). A doença invasiva ocorre pela exposição a clones especialmente virulentos identificados geneticamente (ET-5 para os sorogrupos B e C, ET-37 principalmente para o sorogrupo C e AI / II, AIII e AIV para o sorogrupo A), pela suscetibilidade do hospedeiro, pelo favorecimento à transmissão em situações de aglomerações, aspectos climáticos, ou pela combinação de todos estes fatores. A razão para esta maior virulência de algumas cepas começou a ser melhor compreendida com os estudos de Tinsley e Nassif (2001), a partir do sequenciamento do genoma completo de cepas patogênicas de *N.meningitidis* (de Filippi *et al.*, 2012).

Assim como na maioria dos agentes infecciosos, o envoltório do meningococo é o principal responsável pela interação com o hospedeiro. A evolução desta interação, que pode originar a infecção propriamente dita, exige do microrganismo constantes modificações das suas estruturas permitindo a evasão dos mecanismos de defesa do sistema imune. Desta forma, cada componente tem um papel, parcialmente definido, na colonização, invasão e instalação da DM (deVoe & Gilchrist, 1973).

Os principais fatores de patogenicidade do meningococo são a cápsula, os pili, o LOS (Lipo-oligossacarídeo) e as proteínas de membrana externa. A ação destes fatores é potencializada pela característica do microrganismo em formar evaginações da membrana externa, durante a fase exponencial de crescimento, e sua posterior liberação para o meio sob a forma de vesículas, denominadas de vesículas de membrana externa (VMEs). Estas estruturas, que contêm todos os antígenos presentes na membrana externa, são distribuídas pelo organismo desencadeando efeitos, tais como intensa produção de citocinas e a estimulação de

células inflamatórias responsáveis por vários sintomas comuns nas diferentes manifestações da doença meningocócica (Zoolinger *et al.*, 1972; deVoe, 1992; Verheul *et al.*, 1993; Poolman *et al.*, 1995a).

Após o contato com o microrganismo ocorre a colonização da mucosa da orofaringe, a invasão e a sobrevivência na corrente sanguínea, caracterizando a bacteremia e infecções secundárias da pele, meninges e outras partes do corpo (WHO, 2000).

A invasão do epitélio da nasofaringe é precedida do fenômeno de adesão, que envolve os pili, o LOS, as proteínas Opc e Opa do microrganismo e receptores nas células do hospedeiro CD46 e CD66. A endocitose do agente e sua translocação dentro do vacúolo endocítico ocorrem a partir da transdução de sinais determinada pela ligação aos receptores celulares. O meningococo adere seletivamente às células epiteliais não ciliadas e, após cerca de 12 horas de infecção os vacúolos contendo as bactérias se localizam na parte apical da célula. Após 24 horas de infecção, as células bacterianas são encontradas no tecido subepitelial, próximo ao tecido linfóide. Observa-se perda da atividade ciliar do epitélio e rompimento das junções intercelulares, alterações causadas principalmente pela distribuição da endotoxina pelo organismo no decorrer do processo infeccioso (Steven & Wood, 1995; WHO, 2000; Roupheal & Stephens, 2012).

No Brasil a DM foi descrita pela primeira vez no ano de 1906, se caracterizando pela ocorrência de surtos esporádicos, principalmente nos meses mais frios, e associados aos sorogrupos A, B e C (Morley & Pollard, 2002). Na década de 70 ocorreu uma grande epidemia, causada pelos sorogrupos A e C, que foi controlada com a realização de uma campanha nacional de vacinação, onde o Instituto Merieux foi responsável pelo envio de 80.000.000 doses. Em 1975, com a criação da Planta Piloto de Vacinas Bacterianas em Bio-Manguinhos, ocorreu a transferência de tecnologia da produção da vacina meningocócica AC do Instituto Merieux (Noronha *et al.*, 1995; Barbosa, 2009; Sáfiadi *et al.*, 2012). Na década de 80, ocorreu uma diminuição na incidência do grupo C e desaparecimento do sorogrupo A e prevalência de 83% de DM causada pelo sorogrupo B. A década de 90 foi caracterizada pela diminuição proporcional do sorogrupo B e um aumento progressivo do sorogrupo C. A partir do ano de 2002, houve um aumento na

proporção de casos associados a este sorogrupo (Halperin *et al.*, 2011; Sáfadi *et al.*, 2012).

Com o objetivo de aperfeiçoar o padrão de resposta imunológica obtido com os polissacarídeos capsulares, têm sido utilizados processos de conjugação química dos mesmos a proteínas carreadoras. O acoplamento covalente de polissacarídeos bacterianos, os quais induzem uma resposta imunológica independente de células T, a imunógenos protéicos dependentes de células T, resulta em moléculas que são altamente imunogênicas em crianças e capazes de induzir memória imunológica (Chu *et al.*, 1983; Peeters *et al.*, 1992; Richmond *et al.*, 1999; Peltola, 2000; Harrison *et al.*, 2009). A abordagem de conjugação foi aplicada na obtenção e licenciamento de vacinas contra *Haemophilus influenzae* b (Hib), na década de 80, onde o polissacarídeo foi conjugado a anatoxina tetânica ou a vesículas de membrana externa (VMEs) de *N. meningitidis* sorogrupo B (English *et al.*, 2000). Estas vacinas conjugadas vêm sendo utilizadas há mais de 15 anos na rotina dos programas de imunização de diferentes países, onde a doença invasiva causada por Hib teve um declínio acentuado.

Embora a vacina meningocócica C conjugada tenha sido introduzida no Programa Nacional de Imunizações em 2010, dados do Instituto Adolfo Lutz (IAL), relativos ao total de meningococos isolados nos anos de 2013 e 2014 mostram a predominância do sorogrupo C (aproximadamente 70%) seguido do sorogrupo B (em torno de 20%), e o aparecimento dos sorogrupos W e Y, responsáveis respectivamente por 7,5 e 5% dos isolados de material clínico recebido pelo Instituto. No ano de 2015, comparando as proporções dos sorogrupos C e B, foi observado um aumento proporcional de 38% para o sorogrupo B e a tendência de queda para o sorogrupo C, provavelmente pela introdução da vacinação no país contra este sorogrupo. De acordo com o IAL, entre as amostras do sorogrupo C o sorotipo C:23;P1.14-6 é o prevalente. Entre as amostras do sorogrupo B o sorosubtipo B;4,7;P1.19.15 continua prevalente seguido de cepas porA não tipáveis.

Um estudo realizado por Moraes e colaboradores (2015) permitiu identificar 120 portadores assintomáticos de meningococo entre 1208 estudantes, na faixa de 11 a 18 anos de idade. Neste estudo foi constatada a prevalência do sorogrupo C (13,4%) seguida pelo sorogrupo B (10,0%) e os sorogrupos E, Y, W e Z, respectivamente responsáveis por 7,5%; 5,0%; 2,5% e 0,8%. Dentre os isolados,

60,8% corresponderam a cepas não grupáveis. Com relação aos sorogrupos prevalentes no país, os sorosubtipos isolados foram principalmente C:23:P1.14-6 (37,5%) para o sorogrupo C e B:4,7:P1.19,15 (22,2%) para o sorogrupo B.

Dados do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizados em 2015, apresentam a distribuição dos diferentes sorogrupos do meningococo como causadores de doença meningocócica no Brasil, de acordo com as diferentes faixas etárias (**Gráfico 1**).

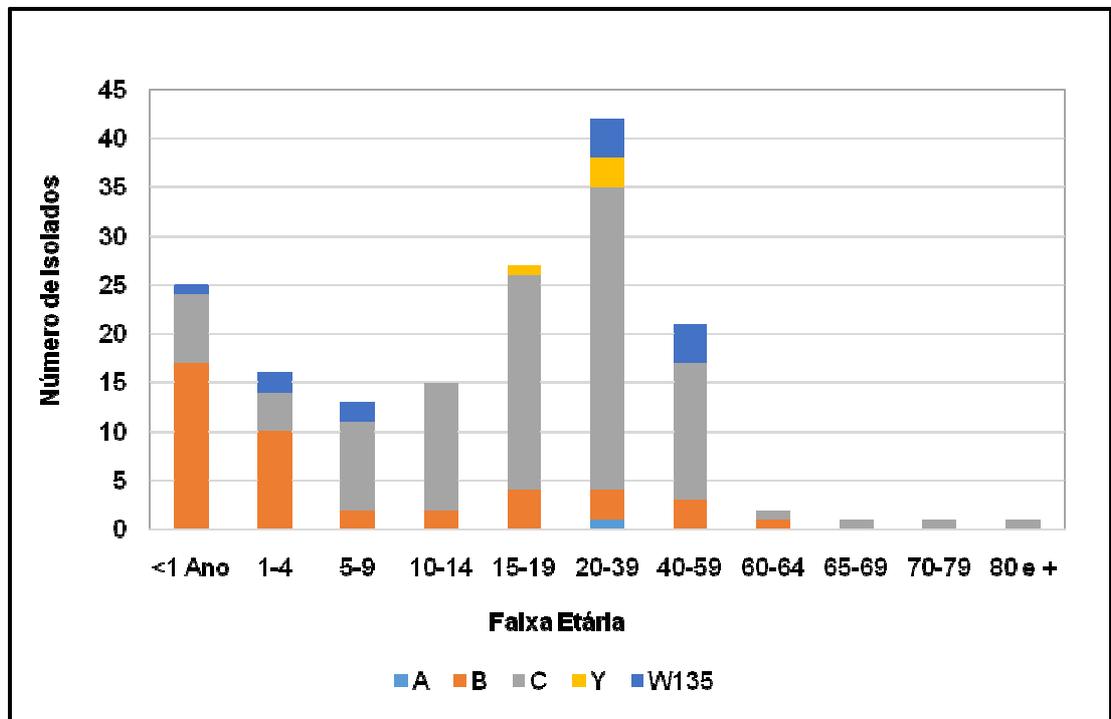


Gráfico 1 Distribuição do número de isolados de *Neisseria meningitidis* por faixa etária no Brasil; Outubro de 2015/SINAN/ MS

Considerando o cenário epidemiológico brasileiro, Bio-Manguinhos projetou o desenvolvimento da vacina brasileira contra o meningococo sorogrupo B, desde 2000. A formulação dessa vacina foi baseada em VMEs das duas cepas de maior prevalência no país e LOS destoxificado (dLOS) da cepa mais prevalente

(Jessouroun *et al.*, 2004). Na fase inicial do desenvolvimento da vacina as duas cepas prevalentes eram B:4,7:P1.19,15 e B:4,7:P1.7,1. A vacina desenvolvida foi testada em crianças de 4 a 11 anos, em 2014.

O estudo clínico de fase II foi realizado para avaliação de imunogenicidade. Foram avaliadas 3 concentrações dos antígenos propostos como objetivo secundário da segurança do produto. Os resultados mostraram que os produtos testes nas 3 formulações aplicadas, foram seguros pois não provocaram qualquer efeito grave sistêmico relacionado as preparações. As vacinas foram imunogênicas induzindo títulos protetores tanto para cepas vacinais como para algumas heteróloga circulantes no país. No entanto a proteção principal foi para a primeira cepa prevalente no país (B:4,7:P1.19,15) com resposta reforço após a 4ª dose de vacina. Não foi observada resposta reforço para a segunda cepa prevalente nem para as cepas heterólogas embora os títulos protetores tenham se mantido 30 dias após a dose reforço.

A Instituição também desenvolveu uma vacina conjugada monovalente contra *N.meningitidis* sorogrupo C, utilizando o método modificado de aminação redutiva e utilizando a proteína monomérica tetânica (PMT) como proteína carreadora (Silveira *et al.*, 2007). Essa vacina também foi submetida ao ensaio clínico de fase II em 2014, sendo observada a indução de memória imunológica vigorosa, após revacinação das crianças com uma dose reforço.

Os dois projetos foram iniciados no final da década de 90 e desde então tinham o objetivo de licenciar as duas vacinas separadamente. Após a finalização da fase I dos ensaios clínicos, foi enviado um pedido para ANVISA, para avaliação da combinação entre as duas vacinas. Na época se pensou em usar a vacina meningocócica B, que tem sua apresentação líquida, como diluente da vacina C conjugada liofilizada, introduzindo uma iniciativa de combinação destas duas vacinas.

Hoje o quadro epidemiológico da DM no Brasil e no mundo vem se modificando e existe um interesse crescente para o uso de vacinas multivalentes contra o meningococo e outros microrganismos capsulados (Tan *et al.*, 2010; Hedari *et al.*, 2014).

A proteção prolongada contra bactérias encapsuladas depende da persistência de títulos altos de anticorpos com atividade funcional, da manutenção da memória imunológica e da imunidade de rebanho. Os resultados obtidos para a

maioria dos esquemas vacinais utilizados, adotados por países que tem introduzido vacinas conjugadas em seus programas de vacinação, apontam queda significativa, em torno de 50%, dos títulos protetores em crianças menores de 1 ano que recebem estas vacinas. Nesta faixa etária, apenas 12% das crianças, vacinadas 4 anos após a última dose de imunização primária, apresentam títulos protetores contra doenças causadas por bactérias encapsuladas. Estratégias, tais como revisão dos esquemas vacinais adotados, utilização de dose reforço e otimização de formulações com diferentes adjuvantes, têm sido avaliadas como possibilidades de melhoria da proteção induzida pelas vacinas conjugadas (Pollard *et al.*, 2009).

O anseio em melhorar a saúde pública, agregado à redução no número de vacinações necessárias para assegurar a proteção contra múltiplas doenças, diminuindo assim, o número de visitas aos órgãos de saúde e os gastos com a administração de vacinas, tem estimulado o desenvolvimento de vacinas combinadas. O grande desafio na combinação de vacinas é manter uma resposta imunológica tão eficaz quanto as vacinas aplicadas separadamente.

Os resultados promissores de segurança e imunogenicidade das duas vacinas antimeningocócicas desenvolvidas por Bio-Manguinhos subsidiaram este estudo de combinação das duas vacinas, com a perspectiva de melhoria da resposta para os componentes vacinais. Os resultados poderão servir como base para o desenvolvimento de uma vacina multivalente contra as meningites.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da combinação entre a vacina meningocócica C conjugada e a vacina meningocócica B na resposta humoral induzida em camundongos, através da qualidade e atividade funcional dos anticorpos induzidos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar, de forma comparativa, a imunogenicidade das vacinas teste, monovalentes e combinadas;
- Determinar a atividade bactericida dos anticorpos induzidos pelas vacinas teste para cepas vacinais e algumas cepas heterólogas de *N. meningitidis* dos sorogrupos B e C;
- Avaliar a proteção induzida em camundongos pelas preparações experimentais em ensaio de desafio com cepas vacinais e heterólogas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Perfil Epidemiológico da Doença Meningocócica

3.1.1 No mundo

A DM tem distribuição global, podendo ocorrer surtos ocasionais e epidemias em qualquer país do mundo. Sua maior incidência ocorre em crianças abaixo de 1 ano com um perfil endêmico na maioria dos países, com a taxa de 1 caso por 100.000 habitantes por ano. No entanto, surtos e epidemias tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos e os mecanismos responsáveis por esta distribuição ainda permanecem pouco conhecidos. A DM apresenta taxa de letalidade em torno de 10%, constituindo um importante problema de Saúde Pública (Dwilow & Fanella, 2015).

A partir de 2012, estima-se que até 1,2 milhões de casos ocorrem anualmente resultando em mais de 100.000 mortes. Recentemente, as taxas de doenças globais no cinturão da meningite Africano, bem como a Europa e os EUA caíram em grande parte devido ao uso de vacinas conjugadas nessas áreas. Cerca de 90% dos casos de DM relatados no mundo são causados pelos sorogrupos A, B, C, W e Y. No entanto, a epidemiologia desta doença tem variado geograficamente ao longo do tempo (**Figura 1**) (Oviedo-Orta *et al.*, 2015; Cohn *et al.*, 2010).

Além disso, dentro de um sorogrupo, surgem frequentemente novos clones, alguns das quais têm uma virulência aumentada e pode ser associado com um surto específico. Talvez o melhor exemplo da natureza geograficamente variável de DM é a epidemiologia distinta da doença no chamado “cinturão da meningite” Africano, em comparação com outras áreas do mundo. Esta área geográfica que se estende em toda região sub-ariana do Senegal à Etiópia é caracterizada por epidemias geralmente anuais de DM, que podem ser associados com incidência de 1000 por 100.000 pessoas/ano, ou seja, 200 vezes maior do que a incidência em outras áreas do mundo (**Figura 2**). No entanto, recentemente a incidência geral diminuiu drasticamente após a introdução da vacina meningocócica monovalente A conjugada, e o aumento de sorotipo W tem sido significativo (Oviedo-Orta *et al.*, 2015).

O sorogrupo W (designado anteriormente como W135) era considerado de baixa ocorrência até que, em 2000, foi identificado como responsável pelo primeiro

surto em peregrinos para Meca durante o Hajj, peregrinação islâmica anual (Hahné *et al.*, 2001). Nesse período, foram diagnosticados 241 casos de doença meningocócica por este sorogrupo, na Arábia Saudita e 90 casos em viajantes após o retorno a 16 diferentes países de origem (Reino Unido, Bélgica, Estados Unidos, França, Marrocos, Kuwait, Arábia Saudita, Oman, Indonésia, Singapura, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Noruega, Alemanha e Holanda) (Traoré *et al.*, 2006).

Nos países de clima temperado, a infecção meningocócica é causada principalmente pelos sorogrupos B e C, e parece ter um caráter sazonal, com a principal ocorrência nos meses de inverno. Alguns autores têm associado esta frequência a outras enfermidades do trato respiratório também mais comuns nesta época, como aquelas causadas por *Mycoplasma* e pelo vírus influenza (Ruttimann *et al.*, 2014).

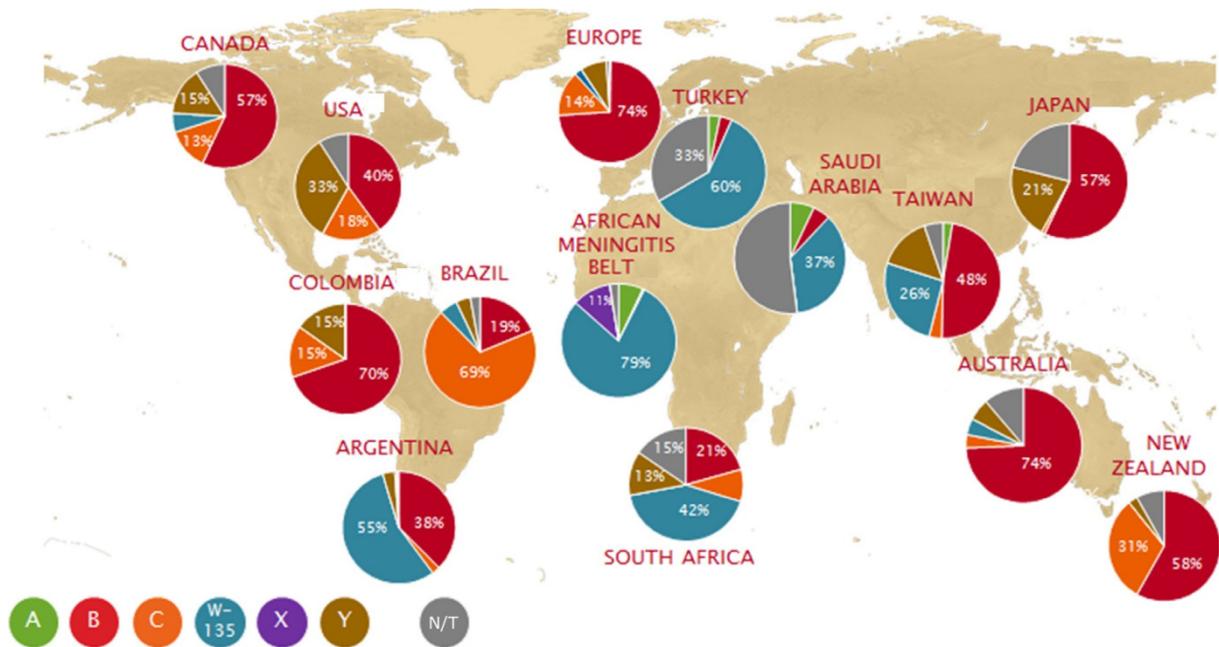


Figura 1 Distribuição dos sorogrupos de *Neisseria meningitidis* causadores de Doença Meningocócica no mundo. Fonte: Oviedo-Orta *et al.*, 2015.

A designação “cinturão da meningite” foi proposta, em 1963, por Lapeyssonnie durante uma missão da OMS na África. Nesta região, a doença meningocócica representa uma ameaça há, pelo menos, 100 anos, com epidemias

recorrentes a cada 8 a 12 anos, especialmente na estação seca quando a umidade do ar é muito baixa e a concentração de partículas de poeira é muito alta (Dwillow & Fanella, 2015).



Figura 2 Distribuição do risco de doença meningocócica nos países africanos com evidência da zona designada por Cinturão Africano da Meningite.

Nos países desenvolvidos, o sorogrupo B predomina em crianças abaixo de 4 anos, sendo responsável pela maioria dos casos de DM, 74% na Austrália, 58% na Nova Zelândia, 74% na Europa e 40% nos Estados Unidos (Leca *et al.*, 2015). O sorogrupo A é prevalente em crianças com idade pré-escolar e o sorogrupo C em adolescentes e adultos jovens. Na Europa, os sorotipos mais frequentes pertencem ao complexo ET-5 (B15:P1.16; B4:P1.15), e são responsáveis por 50% das infecções em crianças com menos de 5 anos. Em seguida, ocorrem na faixa etária de 12 a 15 anos juntamente com os sorotipos C2a e 2b. Nos EUA, o perfil da doença meningocócica é semelhante ao da Europa. No entanto, esta distribuição é variável, pois ocorrem interferências de outras cepas diferentes deste padrão em vários países da Europa, Ásia e Américas (Harrison *et al.*, 2009).

3.1.2 No Brasil

A DM é endêmica no Brasil, com surtos periódicos e diferenças acentuadas de região para região. Nos últimos anos, a incidência de DM tem sido cerca de 1,8 casos por 100.000 habitantes, variando de menos de 1 caso por 100.000 na região Norte, e 3,5 casos por 100 mil no Estado de São Paulo em 2010. A maior incidência da doença é em crianças <1 ano de idade e a taxa de mortalidade global (aproximadamente 20%) foi consideravelmente alta na última década (Sáfadi *et al.*, 2013).

Durante a década de 1970, o Brasil sofreu o impacto de sua maior epidemia de DM, com epicentro em São Paulo. Havia duas ondas epidêmicas que se sobrepunham. A primeira causada pelo sorogrupo C, a partir de abril de 1971. A segunda, associada ao sorogrupo A, a partir de abril de 1974, com a persistência de altas taxas do sorogrupo C. A taxa de incidência atingiu um pico de 179 casos por 100.000 habitantes em 1974. A epidemia permitiu a primeira grande experiência no mundo em que vacinas polissacarídicas A e C foram usadas em larga escala, resultando no controle da epidemia, em 1975 (Moraes & Barata, 2005).

Durante a década de 1980, houve um período de incidência reduzida da doença (1 caso/100 000 habitantes), em que o sorogrupo B se tornou mais prevalente do que C e praticamente não se registraram casos de sorogrupo A. A partir de 1987, ocorreu um aumento no número de casos de sorogrupo B, fenótipo: 4,7: P1.19, 15, em vários locais, em todo o país. Este aumento atingiu o seu pico em 1996, com 7,104 casos registrados (4,5 casos/100 000 habitantes), em grande parte resultante de surtos em grandes cidades, como São Paulo e Rio de Janeiro. Os outros fenótipos predominantes identificados foram B:4,7:P1.7,1 e o fenótipo epidêmico "norueguês" B:15:P1.7,16 (confinado aos estados do sul do país). Estes três sorosubtipos prevalentes pertencem ao mesmo tipo eletroforético, ET-5 (Lemos *et al.*, 2006).

A partir de 2002 um aumento significativo na proporção de casos atribuídos ao sorogrupo C, associado com o complexo ST-103, foi observado sendo este o sorogrupo mais frequente no Brasil (**Figura 3**). O surgimento de sorogrupo W, associado ao complexo ST-11, foi relatado recentemente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Em 2010, o sorogrupo C foi responsável por

75% dos casos identificados, o sorogrupo B para 17%, o sorogrupo W para 6%, e Y sorogrupo para 2% (Iser *et al.*, 2011).

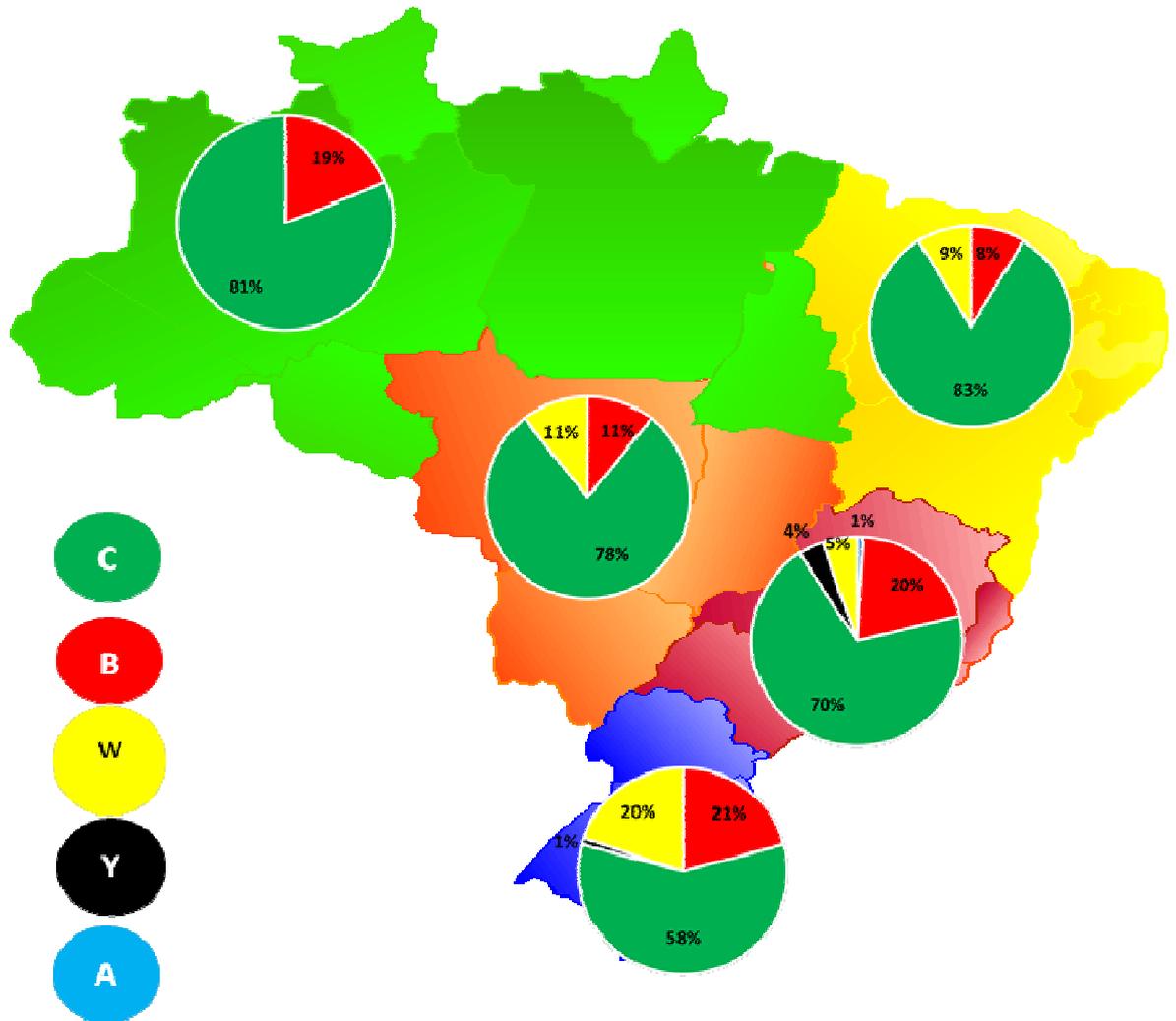


Figura 3 Distribuição dos principais sorogrupos de *Neisseria meningitidis* no Brasil, por região, conforme dados obtidos até outubro de 2015. Fonte: SINAN / MS (Elaboração própria)

3.2 O Agente Etiológico

Neisseria meningitidis é o principal agente etiológico causador de meningite bacteriana aguda, septicemia de origem comunitária e *purpura fulminans* em diversas regiões geográficas, em geral, seguido por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. *N. meningitidis* é ainda conhecida por sua capacidade de causar casos secundários, surtos e epidemias (Harrison, 2006).

A bactéria *N. meningitidis* pertencente à família *Neisseriaceae*, se apresenta como um diplococo Gram-negativo em forma de grão de café ou aspecto reniforme, que se divide transversalmente, o que faz com que possa se apresentar também em tétrades. Seu tamanho varia entre 0,6-1,5 μm , dependendo da fonte de isolamento e da idade da cultura. Apresenta cápsula polissacarídica e fímbrias, é imóvel e não forma endosporos (Vedros, 1984).

O meningococo é exigente nutricionalmente sendo sensível à presença de ácidos graxos nos meios de cultivo. Apresenta metabolismo heterotrófico, necessita de sais minerais e alguns aminoácidos como ácido glutâmico e cistina. É um microrganismo microaerófilo que cresce preferencialmente em atmosfera contendo 5-10% de CO_2 , temperatura ótima entre 35°C e 37°C, oxidase e catalase positivas. Produz ácido a partir de glicose e maltose por metabolismo oxidativo e amônia a partir de peptonas e aminoácidos (Vedros, 1984; Bjune *et al.*, 1991).

A bactéria *N. meningitidis* pode ser encapsulada ou não. No entanto, cepas de *N. meningitidis* que causam doença invasiva e que são isoladas de sítios estéreis, tais como o sangue ou o CSF, são quase sempre encapsuladas. A cápsula é essencial para a sobrevivência do microrganismo no sangue, uma vez que proporciona resistência a morte mediada pelo complemento e inibe a fagocitose (Uria *et al.*, 2008).

A estrutura do envelope celular de *N. meningitidis* apresenta-se de forma característica às bactérias Gram-negativas. Na **figura 4** pode-se observar a camada de peptideoglicana entre duas membranas fosfolipídicas, a membrana citoplasmática e a membrana externa. A membrana externa possui o lipooligosacarídeo (LOS) associado à bicamada de fosfolipídeo onde também estão inseridas às proteínas da membrana externa. A maioria das cepas causadoras de doença apresenta cápsula polissacarídica e pili como apêndices de superfície (deVoe & Gilchrist, 1973; Poolman, 1995b).

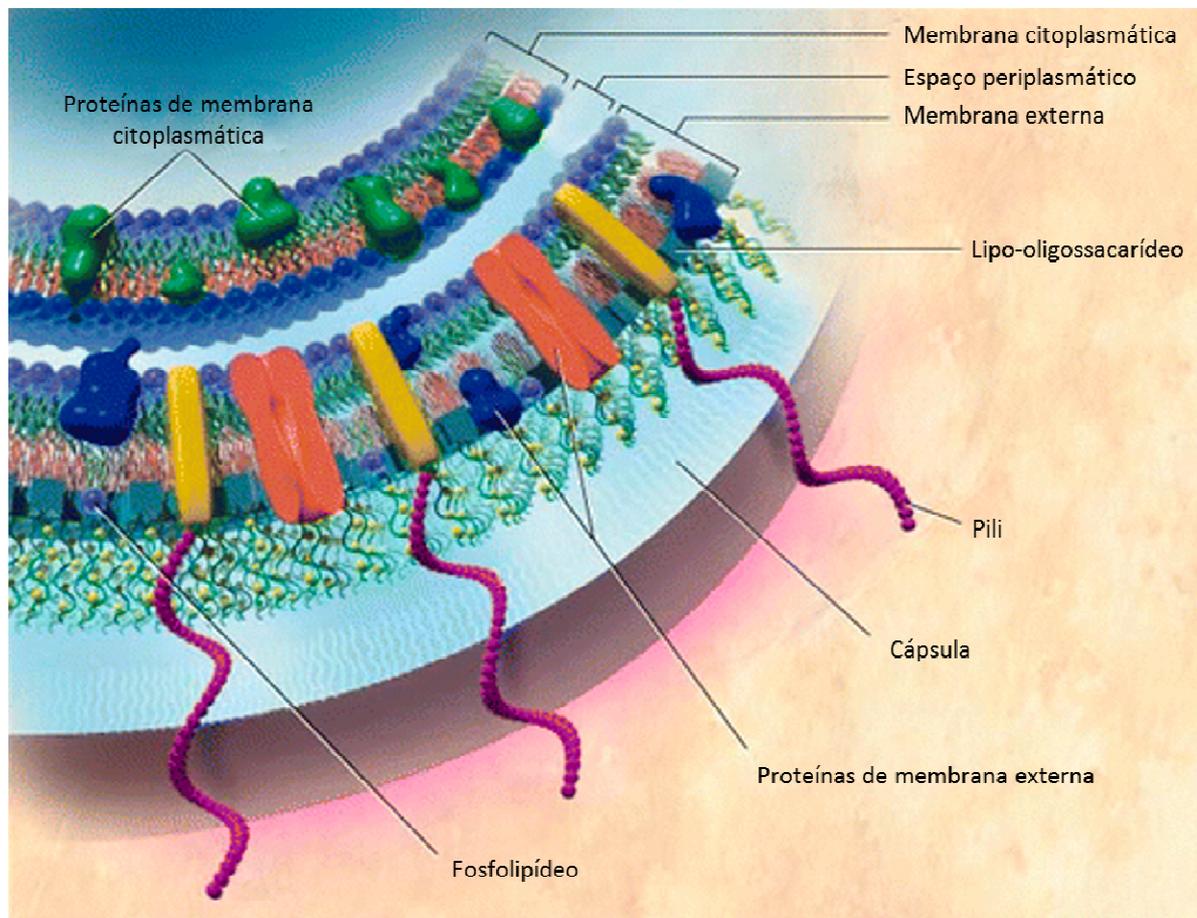


Figura 4 Representação esquemática da parede celular de *Neisseria meningitidis* (adaptado de Stephens *et al.*, 2007)

As proteínas de membrana externa são divididas em cinco classes de acordo com o mapeamento protéico e o peso molecular, o qual pode variar de 44-47 kDa para as proteínas de classe 1, 26-30 kDa para a proteína de classe 5. As proteínas da classe 2 ou 3 não se apresentam simultaneamente no mesmo sorogrupo. As proteínas da classe 1 determinam o sorosubtipo e o imunotipo é baseado na composição do lipo-oligossacarídeo. As diferentes variantes de *N. meningitidis* podem expressar mais de um imunotipo. Atualmente, reconhecem-se 12 imunotipos, sendo que L1 a L9 estão associados aos sorogrupos B e C e L10 – L12 com o sorogrupo A. Dessa forma pode-se classificar uma amostra de meningococo como, por exemplo: *N. meningitidis* B:4:P1.15, L3,7,9 onde (B) é o sorogrupo, (4) é o

sorotipo, (P1.15) é o sorosubtipo e (L3,7,9) o imunotipo. Na literatura são descritos 8 sorotipos e 30 subtipos identificados (Wedege *et al.*, 1990, Jolley & Maiden, 2010).

3.3 Fatores de Virulência

3.3.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é um dos principais fatores de virulência presentes nas estirpes invasivas. Protege a célula bacteriana da fagocitose, opsonização e da atividade bactericida mediada pelo complemento. A presença de cápsula faz diminuir a adesão às células epiteliais mediada pelas proteínas de membrana externa Opa e Opc (Billker *et al.*, 2002).

As cápsulas dos sorogrupos B, C, W, Y contêm ácido siálico, um composto conhecido por inibir a ativação do complemento em células hospedeiras. A cápsula dos grupos B e C são homopolímeros de ácido siálico unidos por ligação α (2,8) - e α (2,9), respectivamente, enquanto as cápsulas de W e Y contêm sequências alternadas de *D*-galactose (W) ou *D*-glicose (Y) e ácido siálico. As cápsulas A e de grupo X não contêm ácido siálico e são compostas de unidades repetidas de O-acetil (α -1'6) ligadas a *N*-acetil-*D*-manosamina-1-fosfato e (α -1'4) ligada a *N*-acetilglucosamina-1-fosfato, respectivamente. Os polissacarídeos A, C, W, Y também são O-acetilados, mas isso parece não ter efeito nas propriedades de resistência do soro conferida pela cápsula (Lewis & Ram, 2014).

O papel fundamental da cápsula é impedir a “morte” do meningococo causada pelo complemento. Estudos mostram que cepas de *N. meningitidis* que carecem de cápsula são altamente sensíveis à destruição por soros humanos, quando comparados com os seus homólogos encapsulados. Além disso, a capacidade de resistir à morte causada pelo soro é melhorada em cepas que expressam maiores quantidades de polissacarídeo capsular (Lewis & Ram, 2014). No **Quadro 1** se encontra a descrição da composição química dos principais sorogrupos patogênicos de *N. meningitidis*.

SOROGRUPO	CÁPSULA POLISSACARÍDICA
A	α – N – acetil D - manosamina – 1 – fosfato
B	α – 2,8, ácido N- acetilneuramínico
C	α – 2,9, ácido N- acetilneuramínico
W	D – galactose e ácido N - acetilneuramínico
Y	D – glicose e ácido N - acetilneuramínico

Quadro 1 Composição química da cápsula polissacarídica dos sorogrupos patogênicos de *Neisseria meningitidis*. Fonte: Yang & Jennings, 2001.

A troca da cápsula, referida na literatura internacional como *capsular switching*, é um mecanismo desenvolvido pelo meningococo para burlar a imunidade induzida pela vacinação ou imunidade natural. Esta estratégia é utilizada por outros patógenos bacterianos encapsulados como *Streptococcus pneumoniae*. Estudos indicam que esta mutação pode ocorrer por conversão do gene da polimerase da cápsula e que este evento ocorre *in vivo* (Beddek *et al.*, 2009).

3.3.2 Pili do tipo IV

Os pili do tipo IV promovem a adesão do meningococo às células do hospedeiro (Merz *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2011)

A fibra de pilus é formada principalmente por subunidades polimerizadas da pilina de 17-21 kDa PilE com a proteína PilC (110 kDa) localizado na ponta de pilus e também no interior da membrana bacteriana. A expressão de pilus do tipo IV e da proteína PilC1 é essencial no processo de adesão inicial (localizada) das cepas capsuladas de *N. meningitidis* às células alvo humanas (Merz *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2011). Nesta fase, a bactéria encontra-se na superfície da célula epitelial rodeada por microvilosidades desta célula hospedeira (**Figura 5**).

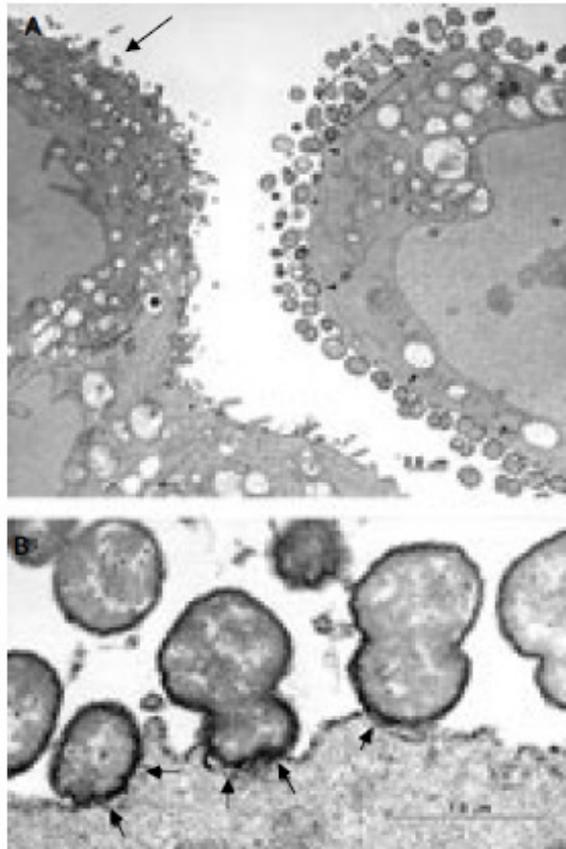


Figura 5 Observação, em microscopia eletrônica, de células epiteliais infectadas com *Neisseria meningitidis*. (A) Numerosas bactérias estão em contato com a célula à esquerda. (B) A amplificação da imagem revela microvilosidades da célula epitelial a envolver a célula bacteriana. Fonte: Deghmane *et al.*, 2000.

As propriedades adesivas de *N. meningitidis* são mediadas por pili, os quais se projetam para além da cápsula e iniciam a ligação a células epiteliais. Espasmos de motilidade gerados pela retração do pilus são importantes para a passagem através da camada de muco epitelial, movimento sobre superfícies epiteliais e formação de microcolonias. As linhagens de meningococos que contêm pili ligam-se em maior número às células da nasofaringe humana em relação às linhagens de meningococos desprovidos de pili. Além disso, pili estão envolvidos na facilitação da absorção de DNA por meningococos e também permitem a aderência a células endoteliais e aos eritrócitos (Proft & Baker, 2009). Os pili meningocócicos são compostos por duas grandes famílias de pilina e sofrem tanto variação de fase quanto variação antigênica o que implica diretamente na virulência dos

meningococos. Estas alterações na estrutura podem modificar a imunoreatividade da proteína no processo de adesão (Taha *et al.*, 2002).

Estabelecida à adesão inicial, segue-se o processo de adesão íntima, durante a qual a bactéria é envolvida pela membrana celular da célula infectada e passa através do epitélio por um processo de endocitose (Nassif *et al.*, 1995). Nesta fase, verifica-se um efeito negativo na expressão de pilC1 e dos genes restantes que codificam as outras pilinas e a bactéria perde os pili. O gene *crgA* (*contact-regulated gene A*), cuja expressão é regulada pelo contato com a célula do hospedeiro, parece ter esse papel regulador.

O gene *crgA* liga-se, durante a fase de adesão íntima, aos promotores dos genes *sai* (*polysialyltransferase genes*), envolvidos na biossíntese do ácido siálico capsular (sorogrupos B, C, Y e W), reprimindo assim diretamente a síntese da capsula.

3.3.3 Proteínas de membrana externa

A membrana externa de *N. meningitidis* possui 5 proteínas principais identificadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com seus pesos moleculares. A proteína de classe 1 ou PorA cujo peso molecular varia entre 44-47 kDa, está presente na maioria das cepas, apresentando grande heterogeneidade estrutural. A expressão desta proteína sofre variação durante as diferentes fases de crescimento da bactéria e os anticorpos induzidos contra ela são altamente bactericidas. As proteínas de classe 2 e 3, denominadas também de PorB, são mutuamente excludentes. Seus pesos moleculares variam de 40 kDa a 42 kDa para classe 2 e 37-39 kDa para classe 3 (Poolman *et al.*, 1995a, Massari *et al.*, 2003).

A proteína de classe 4 ou Rmp (*Reduction modifiable protein*), está presente em todas as cepas, tem peso molecular que varia entre 33 kDa e 34 kDa e parece ter a capacidade de induzir anticorpos neutralizadores de anticorpos com atividade bactericida. As proteínas de classe 5, denominadas de opacidade (Opa) tem peso molecular entre 26 kDa e 30 kDa e, uma mesma cepa poder expressar mais de um tipo, existe grande variabilidade entre elas em relação ao aspecto qualitativo e quantitativo. Está associada às proteínas de classe 5 a proteína 5C ou Opc que está

relacionada aos fenômenos de adesão e invasão de células epiteliais. As proteínas de classe 5 induzem a produção de anticorpos bactericidas (Massari *et al.*, 2003).

Proteínas	Peso Molecular (kDa)	Características da proteína
Classe 1 (Por A)	44 a 47	Presente em todas as cepas de <i>N.meningitidis</i>, variável, tripsina sensível e insolúvel em desoxicolato
Classe 2 (Por B)	40 a 42	Porina, resistente a tripsina, insolúvel em desoxicolato
Classe 3 (Por B)	37 a 39	Características semelhantes a Classe 2. São mutuamente excludentes
Classe 4 (Rmp)	33 a 34	Presente em todas as <i>N.meningitidis</i> resistente a tripsina
Classe 5 (Opa/Opc)	26 a 30	Sensível ao calor e enzimas proteolíticas, solúvel em desoxicolato, altamente variável

Quadro 2 Principais proteínas de classe da membrana externa da *Neisseria meningitidis* e suas características. Fonte: Arigita *et al.*, 2001.

A classificação dos meningococos em sorotipos e sorosubtipos, classicamente utilizada, considera a presença de PorB 2 ou 3 para definição de sorotipo e as variantes da PorA para o sorosubtipo. Com o avanço das técnicas de tipagem molecular, a sorotipagem deste microrganismo tem levado em conta o mapeamento das regiões variáveis tanto do gene de PorA como de PorB, inclusive como marcadores epidemiológicos em surtos epidêmicos (Classen *et al.*, 1996; Sacchi, 2000; Roupael & Stephens, 2012).

As cepas de *N. meningitidis*, quando cultivadas em condições de restrição de ferro, expressam proteínas reguladas por este íon, como por exemplo, as proteínas

ligadoras de Lactoferrina A e B, de Transferrina 1 e 2 e uma proteína de 70 kDa responsável pela internalização do íon férrico. Estas proteínas ainda não têm suas funções totalmente definidas. Para o meningococo a aquisição de ferro é a chave para a sua patogênese, que envolve múltiplos sistemas de aquisição e receptores protéicos para o ferro (Alamro *et al.*, 2014).

Outras proteínas têm sido descritas mais recentemente na membrana externa e parecem ter papel importante tanto na DM como na imunidade induzida por vacinas que contenham estas moléculas.

A proteína ligante do fator H, fHBP é uma lipoproteína que está presente na membrana externa de todas as cepas de *N. meningitidis* e estimula a produção de anticorpos bactericidas. De acordo com sua diversidade genética, a fHBP foi dividida em três variantes denominados 1, 2 e 3 (classificação Novartis) ou famílias A e B (classificação Pfizer), onde a família A corresponde as variantes 2 e 3 e a família B corresponde a variante 1. De acordo com estudos de Feavers & Pizza (2009) a variante 1 está presente em 80% das cepas investigadas e a variante 2 em apenas 10% destas linhagens.

A proteína FetA (ou FrpB) é uma OMP (proteína de membrana externa) reguladora de ferro, pertencente à família de receptores dependentes de TonB. A imunização de animais de laboratório mostrou que FetA induziu a produção de anticorpos bactericidas específicos para a cepa estudada, dirigidos para o quinto *loop* da proteína exposta na superfície, uma região que exhibe diversidade de sequências considerável entre os isolados meningocócicos (Feveares & Pizza, 2009).

NadA (*neisserial adhesin A*) é uma adesina que possui homologia com uma família de proteínas envolvidas com o processo de invasão e patogenia. NadA é capaz de induzir uma forte resposta bactericida e se mostrou eficiente no processo de interrupção da colonização e prevenção da doença. Estudos mostraram que os soros de pacientes, que relataram a doença meningocócica, reconhecem a proteína (Leca *et al.*, 2015), demonstrando que NadA desempenha um papel importante não só na virulência do meningococo, mas também na imunogenicidade em humanos. Sabe-se que essa proteína está presente em 50% dos isolados patogênicos de *N. meningitidis*, sendo frequentemente associado a cepas pertencentes a clones hipervirulentos (Feavers & Pizza, 2009).

NHBA (*Neisserial Heparin-Binding protein*) é uma lipoproteína presente em quase todos os isolados de *N. meningitidis* e tem como função recrutar a heparina para a superfície da célula aumentando assim a resistência ao soro. Estudos demonstraram que NHBA foi capaz de induzir anticorpos bactericidas específicos. A identidade entre os aminoácidos das subvariantes de NHBA é cerca de 54%, no entanto apresentaram bons níveis de resposta imunológica tendo em vista a reatividade cruzada entre elas. Essa característica reforça a importância da inclusão deste antígeno em uma vacina meningocócica multicomponente (Seruto *et al.*, 2010).

3.3.4 Lipo-oligossacarídeo

A endotoxina ou lipo-oligossacarídeo (LOS) é um dos principais componentes da membrana externa de Gram negativos sendo responsável pela sua estabilidade. Tem um papel importante na estimulação da libertação de mediadores inflamatórios em infecções causadas por estes microrganismos (Lewis & Ram, 2014).

O LOS é um glicolípido que, de forma geral, apresenta uma estrutura composta de um núcleo oligossacarídeo ligado a parte lipídica, o lipídio A, através de um ou dois KDOs (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico) (Stephens 2009).

A parte glicídica da molécula se divide no chamado *outer core* ou antígeno O, que está ligado covalentemente à porção lipídica através do *inner-core*. A endotoxina de *N. meningitidis* tem a parte glicídica mais curta por não apresentar o antígeno O que está presente em outras bactérias Gram negativas (**Figura 6**). Sua estrutura é formada de até 10 unidades glicosídicas que podem ser N-acetil glicose, glicose, galactose, ácido N-acetil-neuramínico e N-acetil galactose. Em função desta característica é chamado de lipo-oligossacarídeo ou LOS. Este oligossacarídeo, “in vivo” sofre um processo de adição de resíduos de ácido siálico (sialização) no tetrassacarídeo terminal, lacto-N-neotetrose (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNac β 1 \rightarrow 3 Gal β 1 \rightarrow 4Glc) por ação das enzimas acil transferases tanto do microrganismo como do hospedeiro, aumentando a cadeia glicídica da molécula. A sialilação do LOS interfere na antigenicidade da molécula, pois mascara epítomos antes disponíveis, impedindo a ativação da via alternativa do sistema complemento.

O lipídeo A, que forma a parte lipídica do LOS, é composto de um dissacarídeo bi-fosforilado que possui 4 ácidos graxos acilados (posições 2, 3, 2' e 3'). A parte lipídica fica inserida na camada fosfolipídica da membrana externa, enquanto a glicídica é projetada como um apêndice da célula bacteriana (Poolman, 1995b; Preston *et al.*, 1996) (**Figura 6**).

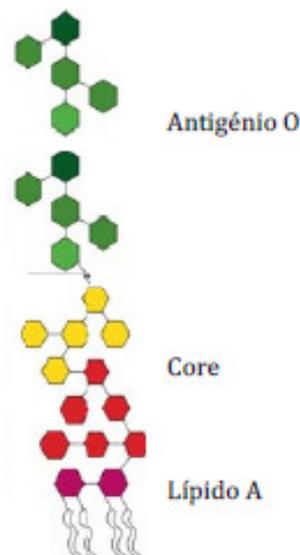


Figura 6 Representação esquemática de lipo-oligosacarídeos de *Neisseria meningitidis*. Adaptado de <http://www.biomin.net/pt/solucoes/gerenciamento-de-riscos-causados-por-endotoxinas/>. Consultado em Dezembro 2014.

O lipídeo A é o responsável pela toxicidade e atividade biológica do LOS sendo um potente ativador da resposta inflamatória, na DM pode ocorrer tanto dentro do compartimento vascular quanto no sistema nervoso central (SNC). De fato, tanto a severidade quanto a letalidade da infecção meningocócica estão relacionadas aos níveis de LOS circulantes no sangue. Variações estruturais no lipídeo A como, o grau de fosforilação, a carga da molécula, a simetria, número e comprimento das cadeias de acil, influenciam na atividade biológica. As variações no teor de sacárideo na endotoxina foram relatados como determinantes estruturais da ativação de macrófagos por diferentes endotoxinas (Zughaier *et al.*, 2004).

O LOS se liga a proteínas transportadoras formando um complexo que irá se ligar a um receptor de membrana denominado de CD14, o qual está presente em

várias células do sistema imunológico, tais como macrófagos e células dendríticas. Subseqüentemente, o receptor CD14 interage com um receptor transmembrana denominado TLR-4 e seu cofator denominado de fator 2 de diferenciação mielóide (MD-2), os quais, por sua vez, geram um sinal dentro da célula para que ocorra a transcrição dos genes envolvidos com a síntese de citocinas (Mogensen, 2009). Isto provoca a secreção de algumas citocinas (incluindo IL-6 e TNF- α) que, em níveis elevados podem resultar em dano endotelial e no extravasamento capilar. Existe uma correlação direta entre os níveis de LOS e gravidade da doença meningocócica (Zughaier *et al.*, 2007).

Além disso, a molécula de LOS desempenha um importante papel na ativação da cascata de coagulação via fator tecidual (Fransen *et al.*, 2009). O LOS apresenta sítios para ligação de C3b e C4b, a ativação do complemento parece ser independente da expressão de LOS. Já foi observada uma relação entre a gravidade da doença e a ativação do complemento, que pode estar associada à capacidade do complemento ativado liberar a endotoxina (Lewis & Ram 2014).

O LOS também desempenha um papel importante na resistência a outras defesas do hospedeiro. Os meningococos são resistentes a peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs), devido a estruturas presentes no lipídio A. CAMPs estão presentes em macrófagos e neutrófilos, e ocasionalmente, produzida pelas células epiteliais em superfícies mucosas. Esses peptídeos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana e são componentes chave das respostas imune inata (Rouphael & Stephens, 2012).

O gênero *Neisseria* pode expressar 1 ou mais tipos de endotoxina e as diferenças estruturais da molécula de LOS determinam os 12 imunotipos diferentes de *N. meningitidis*. Os imunotipos L1 até L8 são encontrados principalmente nos sorogrupos B e C enquanto L9 a L13 estão associados ao sorogrupo A. A presença do imunotipo L8 tem sido relacionado ao aumento de sensibilidade do meningococo à atividade bactericida do soro (Frasch *et al.*, 1976; Poolman *et al.*, 1995a).

3.4 Resposta Imune ao Meningococo

Os primeiros mecanismos de defesa que são mobilizados na infecção meningocócica, pertencem à imunidade inata com a participação dos fagócitos mononucleares, neutrófilos, células *natural killer*, lecitinas ligadoras de manose e sistema complemento. Em seguida os anticorpos de imunidade natural ou induzidos pela vacinação tem papel fundamental. A mobilização destes processos depende do reconhecimento, pelo hospedeiro, dos diferentes tipos de antígenos de superfície do microrganismo (Gasparini *et al.*, 2012).

Quando o meningococo penetra na corrente sanguínea, o microrganismo é amplamente exposto a numerosos mecanismos imunitários de defesa, especialmente para o sistema do complemento. Em particular, a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos fagócitos causa uma inflamação que aumenta a probabilidade da bactéria atravessar a barreira endotelial. O sistema complemento pode ser ativado através de três vias: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. Todos os mecanismos de ativação do sistema complemento convergem no ponto de ligação covalente ao factor C3b. Ativação de C3b permite alcançar três objetivos, tais como: o processamento do antígeno, por imunidade celular e humoral adaptativa; ativação de C5b-9, para o rompimento de membrana da bactéria; e morte do microrganismo por fagocitose (Gasparini *et al.*, 2012).

Além disto, os polissacarídeos capsulares, constituídos de ácido siálico, são capazes de inibir a via alternativa de ativação do complemento, componente importante da imunidade inata. Indivíduos com deficiência dos componentes terminais do complemento (C5-C9) podem desenvolver a doença e cerca da metade destes indivíduos podem ter ataques recorrentes. Por outro lado, indivíduos com deficiência em properdina ou fator D podem desenvolver a doença com taxas de morte superiores a 50% e sem recorrência entre os sobreviventes (Ross & Densen, 1984, Serruto *et al.*, 2010).

Desde os estudos de Goldschneider e colaboradores (1969), a suscetibilidade à doença meningocócica está relacionada à ausência de anticorpos com poder bactericida. A maior incidência de DM é em crianças menores que dois anos de idade. Cerca de 50% dos recém-nascidos apresentam atividade bactericida antimeningocócica, proveniente da transferência transplacentária de anticorpos maternos e conseqüentemente não são susceptíveis à doença. Entretanto, a

imunidade cai rapidamente e as crianças com idade entre 6 e 18 meses apresentam alto risco de infecção causada por bactérias encapsuladas. Isto se deve ao fato destas crianças não apresentam uma subpopulação específica de célula B presente na zona marginal de órgãos linfóides, responsável pelo reconhecimento e resposta ao polissacarídeo capsular. Durante os anos seguintes de vida ocorre evolução na maturação da resposta imune devido à exposição natural aos microrganismos, onde 50 a 80% das crianças a partir de 12 anos possuem anticorpos com atividade bactericida e no caso dos indivíduos adultos este valor está entre 65 e 85% (Goldschneider, Gotschlich & Artenstein, 1969a, 1969b; Pollard & Frasch, 2001).

Durante a reação imune, as respostas celulares primárias produzem anticorpos IgM de baixa afinidade. Com a progressão dessa resposta, a maturação das células B toma lugar, aumentando a sua afinidade pelo antígeno. Ocorre então um *switch* de classe das imunoglobulinas em que a partir da produção de IgM se formarão as IgGs, fenômeno que exige a seleção de clones celulares de alta afinidade com maior capacidade de reconhecimento a agentes externos.

Em alguns casos a quantidade de anticorpos bactericidas se torna limitada, como no caso de crianças menores de 2 anos de idade que recebem vacinas antimeningocócicas polissacarídicas (Granoff *et al.*, 1998).

A baixa imunogenicidade do polissacarídeo do grupo B é explicada pela sensibilidade a neuraminidases e semelhança estrutural com unidades de ácido siálico existentes em tecidos humanos, presentes em moléculas de adesão de células neurais (N-CAM) de humanos. Esse mimetismo molecular é responsável pelo não reconhecimento da cápsula como um antígeno estranho ao hospedeiro e, conseqüentemente, pela não produção de anticorpos e, por isto, a atividade lítica do soro tem sido atribuída a outros antígenos não capsulares (Segal & Pollard, 2005). Entre eles, estão PorA, Opc, Opa (classe 5), proteínas reguladas pelo ferro (IRPs) e LOS, que induzem anticorpos com poder bactericida.

Existem evidências que a opsonofagocitose tem um papel importante na eliminação de meningococos dos grupos B e E29, enquanto é pouco expressiva para os grupos A e C (Coureuil *et al.*, 2013).

O isotipo das imunoglobulinas induzidas pelos antígenos não capsulares e o índice de avidéz são parâmetros importantes na avaliação de proteção à doença meningocócica. O entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune

aos meningococos define as abordagens a serem tomadas para o desenvolvimento de novas vacinas (Sadarangani & Pollard, 2010).

A situação de portador assintomático tem sido considerada como responsável pela imunidade natural contra *N. meningitidis*, em função da presença de IgA e IgG em alguns indivíduos analisados. Por outro lado, estes indivíduos constituem uma fonte de transmissão do microrganismo aos indivíduos não portadores, que representam o grupo de risco potencial de infecção. A eficiência deste tipo de imunidade contra os meningococos fica comprometida pela capacidade da maioria das cepas produzirem IgA proteases, enzimas capazes de degradar os anticorpos presentes na mucosa (Griffiss, 1995; Silveira, 2007).

Algumas características da DM como: a sua rápida evolução, gravidade, letalidade e potencial endêmico, fazem com que a possibilidade de prevenção dessa infecção pela utilização de vacinas assumam fundamental importância. Com isso, a busca pelo desenvolvimento de vacinas antimeningocócicas que induzam altos títulos bactericidas, anticorpos com índice de avidéz elevado e persistência dos mesmos, tem sido um dos principais aspectos a serem considerados quando da definição de protocolos para a produção e avaliação de vacinas.

3.5 Vacinas Contra o Meningococo

3.5.1 Vacinas contra os sorogrupos A, C, W e Y

Os polissacarídeos meningocócicos foram as primeiras vacinas bacterianas definidas quimicamente. Estes compostos se mostraram imunogênicos em adultos e crianças acima de 2 anos de idade e foram objeto de vários ensaios clínicos em países da Europa, Américas e África (Frasch, 1995).

Estas moléculas, como todos os polissacarídeos, são antígenos T independentes e a capacidade dos indivíduos responderem a estas moléculas, depende da maturidade imunológica relacionada com a idade. São antígenos que não induzem memória imunológica. O polissacarídeo A, no entanto, induz resposta em crianças com 3 meses de idade e apresenta efeito de reforço após uma segunda dose. Acredita-se que este efeito não caracteriza uma resposta imunológica do tipo secundário e sim uma maior capacidade desta molécula estimular linfócitos B

primados por contatos anteriores com o polissacarídeo ou antígenos que apresentam reatividade cruzada (Frasch, 1995).

Outra característica importante dessas vacinas é que mesmo em crianças acima de 2 anos de idade, a proteção conferida possui duração limitada, não sendo capazes de induzir memória imunológica (Sáfadi *et al.*, 2012). Isso faz com que as vacinas polissacarídicas não sejam usadas de maneira rotineira, estando indicadas apenas para grupos de alto risco ou na presença de surtos ou epidemias (Danzig, 2004, Sáfadi *et al.*, 2012).

Existem as vacinas monovalentes (A e C), as bivalentes (AC) produzidas em alguns países da Europa, entre eles a França, e as tetravalentes (A, C, Y e W) (Hedari *et al.*, 2014).

Estas últimas são produzidas nos Estados Unidos, Bélgica e França. No Brasil, a Fundação Oswaldo Cruz em parceria com o Instituto Finlay em Cuba tem fornecido vacina bivalente A e C para UNICEF.

As vacinas polissacarídicas provaram ser seguras e capazes de induzir anticorpos bactericidas em crianças com mais de 4 anos e adultos. No entanto, a soro proteção induzida por essas vacinas é de curta duração, sendo de 1 a 3 anos em crianças com menos de 5 anos de idade e até 5 anos em adolescentes e adultos sem indução de imunidade de rebanho (Hedari *et al.*, 2014).

Em função das limitações das vacinas polissacarídicas, desde o final da década de 1990, o uso de vacinas conjugadas meningocócicas tornou-se generalizado no mundo desenvolvido. Estes produtos são superiores às vacinas polissacarídicas na indução de respostas de células T e B, em induzir imunidade em crianças com menos de 2 anos de idade, memória imunológica e maior persistência de títulos bactericida protetores, em todos os grupos etários (Hedari *et al.*, 2014).

A conjugação química de polissacarídeos a carreadores protéicos tem sido empregada para moléculas de diferentes origens bacterianas com a transformação destes antígenos em T dependentes, conseqüentemente capazes de induzirem memória imunológica. Esta abordagem foi aplicada na obtenção de vacinas contra *H. influenzae* tipo b em que seu polissacarídeo foi conjugado ao toxóide tetânico (SmithKline) ou a vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* (Merck) (English *et al.*, 2000). A natureza da proteína utilizada como carreador e a metodologia utilizada na obtenção destes compostos são importantes fatores que irão definir a resposta imunológica contra estas vacinas (Jones *et al.*, 1996).

Os primeiros estudos para obtenção de vacinas conjugadas contra *N. meningitidis* foram realizados na década de 80, para os sorogrupos A, B e C por Jennings e colaboradores (1981), conjugando os polissacarídeos oxidados por periodato diretamente aos resíduos de lisina da proteína toxóide tetânico. Os conjugados obtidos com polissacarídeos dos sorogrupos A e C foram imunogênicos em animais, enquanto que o mesmo não foi observado para o polissacarídeo do sorogrupo B (Jennings & Lugowski, 1981). Posteriormente o grupo de Beuvery, trabalhando na obtenção de conjugados meningocócicos A e C também com toxóide tetânico, comprovou a resposta imunológica T-dependente através da observação de resposta secundária, memória imunológica e persistência da resposta obtida (Beuvery *et al.*, 1983).

Em setembro de 2010, o Brasil foi o primeiro país latino-americano a incorporar a vacina meningocócica C conjugada no PNI, coma recomendação do uso de duas doses aos 3 e 5 meses de idade, e uma dose de reforço aos 12 meses. Crianças entre 12 e 23 meses recebem uma única dose da vacina. Atualmente o PNI está discutindo o aumento da faixa etária do uso dessa vacina, estendendo até adolescentes (Sáfadi, 2010).

3.5.2 Vacinas contra o sorogrupo B

Enquanto as vacinas polissacarídicas conjugadas contra os sorogrupos A, C, Y e W, tem se mostrado eficazes, o mesmo não acontece para vacinas polissacarídicas ou conjugadas para sorogrupo B. Testes clínicos com seres humanos em que foram avaliadas diferentes concentrações de polissacarídeo B (10 a 250 µg/dose) não mostraram aumento de anticorpos nos indivíduos vacinados. A baixa imunidade desta molécula tem sido explicada pela sua semelhança estrutural com resíduos de ácido siálico existentes em tecidos humanos. Além disso, esta molécula também apresenta sensibilidade a ação de neuraminidases (Richmond *et al.*, 2000; Holst *et al.*, 2009).

Devido a estes fatores, os antígenos subcapsulares são alvos de estudo como alternativas de vacinas contra o sorogrupo B. O uso de proteínas de membrana externa purificadas e a utilização das vesículas de membrana externa (VME) como complexo multiantigênico tem sido proposto por vários grupos de pesquisa no tema (Holst *et al.*, 2009; Leca *et al.*, 2015).

O uso de VMEs normalmente produzidas pelo meningococo durante a fase exponencial de crescimento, foi sugerido para compor vacinas em função da possibilidade de obtenção do complexo antigênico na sua forma nativa (Zollinger *et al.*, 1978; deVoe, 1992).

As primeiras vacinas de VMEs foram desenvolvidas no final dos anos 70 e o material protéico, tratado com detergente, era precipitado com etanol e ressuspenso em cloreto de sódio. Este material se mostrava particulado e com endotoxina residual em torno de 5 a 10 µg /100 µg de proteínas (Zollinger *et al.*, 1978).

A abordagem da obtenção de uma vacina de VME foi adotada por Cuba a partir do cultivo de uma cepa de *N. meningitidis* sorogrupo B, sorotipo 4 e subtipo P1.15 prevalente no país. Esta vacina, hoje licenciada, é composta por 50 µg de proteínas em vesículas, a mesma quantidade de polissacarídeo C e um complexo protéico de alto peso molecular. Os antígenos são adsorvidos em 2 mg de hidróxido de alumínio por dose (Frasch, 1995).

No Brasil, entre 1989 e 1991, a vacina cubana (VA-MENGOC-BC[®]) apresentou proteção variável de acordo com a idade do grupo vacinado. Para crianças com mais de 48 meses observou-se uma eficácia de 74%, enquanto em crianças menores não foi observada proteção. Posteriormente, foram vacinadas 1,7 milhões de crianças de 6 meses a 9 anos com duas doses de vacina. Após 12 meses da segunda dose a eficácia geral da vacina foi de 54-57% com comprovação de ausência de resposta em crianças abaixo de 2 anos. Estes resultados foram confirmados por dados com a mesma vacina no Chile (de Moraes *et al.*, 1992; Noronha, 1993; Milagres *et al.* 1994; Boslego *et al.*, 1995).

Na Noruega também foi desenvolvida uma vacina de VME que foi empregada em teste clínico, porém com formulação composta de 25µg de proteínas, sem polissacarídeo C, com sacarose como estabilizador e hidróxido de alumínio como adjuvante. A vacina foi administrada em duas doses com intervalo de 6 semanas. A eficácia após 29 meses da segunda dose foi de 57% sendo que 30% dos vacinados não apresentou título de atividade bactericida no soro. Um ano após a segunda dose, observou-se uma queda significativa nos anticorpos totais por ELISA, assim como no título bactericida. Cinco anos depois foi selecionado um grupo dentre estes que receberam duas doses de vacina, para receber uma terceira dose. Um ano depois da terceira dose ocorreu uma queda dos anticorpos totais, mas 74-92% dos

vacinados apresentavam atividade bactericida contra as cepas teste (Hoiby *et al.*, 1991; Gotschlich, 1993; Rosenqvist *et al.*, 1995).

De acordo com estes estudos de eficácia observa-se que os antígenos não capsulados que compõem as VMEs induzem proteção contra a doença meningocócica causada pelo sorogrupo B sendo, no entanto, esta proteção idade dependente. Contrariamente ao esperado para antígenos protéicos, as vacinas de VME, desenvolvidas até hoje, induzem resposta de curta duração e não protegem crianças abaixo de 2 anos, faixa etária principalmente acometida pela doença. Também ficou evidente a necessidade de pelo menos três doses de vacina para obtenção de resposta significativa para os antígenos destas preparações. Além disso, a imunidade induzida por estas vacinas parece ser sorosubtipo específica (Milagres *et al.*, 1995; Sacchi, 2000).

Em função das limitações de resposta cruzada para diferentes sorosubtipos de cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B, não vacinais, a busca de antígenos conservados entre os diferentes sorosubtipos deste patógeno tem tido especial atenção na busca de vacinas mais eficazes. O uso da vacinologia reversa onde o genoma bacteriano sequenciado aponta para a existência de proteínas de superfície com potencial vacinal foi muito importante na pesquisa de novos alvos. Essa estratégia possibilitou a identificação de novas proteínas alvo para a produção de uma vacina que poderia prevenir as DM causadas por este sorogrupo (Rappuoli, 2000; Pizza *et al.*, 2000; Sette & Rappuoli, 2010).

A determinação do genoma completo da *N. meningitidis* sorogrupo B por Tettelin e colaboradores (2000), forneceu informações essenciais para a pesquisa de uma vacina eficiente contra o meningococo B. Por análise computacional (*in silico*), foram encontrados 600 novos antígenos. Trezentos e cinquenta desses antígenos, potencialmente localizados na superfície bacteriana, foram expressos em *Escherichia coli*, purificados e utilizados para imunizar camundongos. Os soros obtidos foram testados para verificar a presença de anticorpos bactericidas contra a *N. meningitidis*. Desses, 25 induziram a formação de anticorpos bactericidas. Muitos desses antígenos apresentaram sequências conservadas em uma população significativa de meningococos, sugerindo a possível indução de imunidade contra uma grande variedade de cepas heterólogas (Rappuoli, 2000; de Fillipis, 2009; Tan *et al.*, 2010).

Além disso, esses antígenos foram reconhecidos por soros de pacientes que tinham desenvolvido a DM. Após essa descoberta, a Novartis selecionou 3 proteínas, fHBP, NadA e NHBA, para serem inicialmente estudadas como possíveis antígenos vacinais, adicionadas de VME da cepa prevalente na Nova Zelândia.

Esta é a formulação da vacina 4CMenB (quatro componentes contra o meningococo B), recentemente comercializada sob o nome Bexsero®. Ela obteve a autorização para ser comercializada na Europa em janeiro de 2013, como a primeira vacina de largo espectro para a *N. meningitidis* sorogrupo B (Roderick & Finn, 2014). Em agosto de 2013, esta vacina também foi aprovada na Austrália, em janeiro de 2015 nos Estados Unidos e, em abril de 2015, no Brasil (Leca *et al.*, 2015).

Em outubro de 2014, outra vacina meningocócica para o sorogrupo B, Trumemba®, foi licenciada nos Estados Unidos. Esta vacina consiste de duas variantes fHBP imunologicamente distintas (A05 e B01). Embora ensaios clínicos para esta segunda vacina tenham sido realizados nos Estados Unidos, Austrália, e também na Europa, ela ainda não está licenciada na Europa (Leca *et al.*, 2015).

Os dados de ensaios clínicos sobre a vacina 4CMenB demonstram sua imunogenicidade em crianças, adolescentes e adultos. Em crianças, qualquer que seja o esquema de vacinação (vacinação primária aos 2, 4 e 6 meses ou 2, 3 e 4 meses), mais de 99% desenvolvem títulos protetores para fHBP e NadA e 79 a 87% para o componente VME, 1 mês após a última dose (Dwilow & Fanella, 2015).

Embora os dados de imunogenicidade induzida pela 4CMenB sejam preliminares, esta requer, assim como as outras vacinas para o sorogrupo B, três doses de imunização primária para obter proteção suficiente, apresentando também diminuição de títulos bactericidas ao longo do tempo.

No entanto, a autorização de comercialização da vacina 4CMenB está trazendo esperança de controle de epidemias meningocócicas, embora um plano de vigilância pós implementação seja necessário para acompanhar a evolução do clones bacterianos e para aprimorar os programas de imunização (Kaaijk & van der Ende, 2013).

Na **Figura 7** estão representados os principais marcos históricos no desenvolvimento de vacinas meningocócicas.

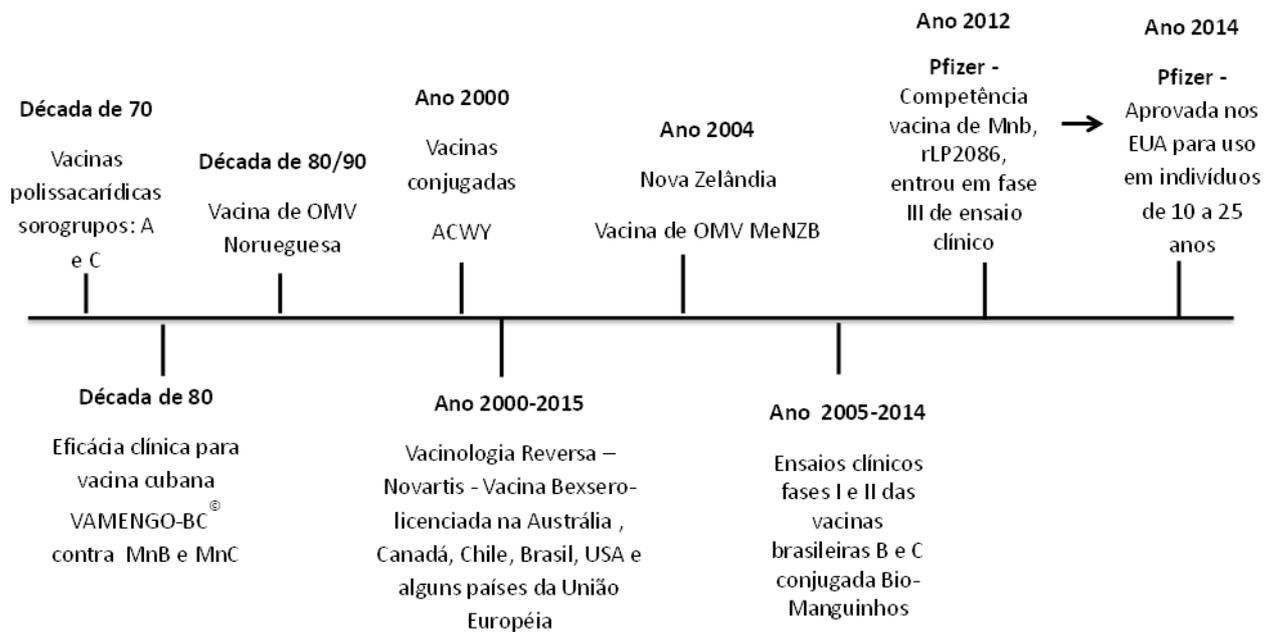


Figura 7 Histórico das vacinas meningocócicas.

3.6 Vacina Meningocócica B Brasileira

Utilizando a estratégia de busca de antígenos sub-capsulares que possam induzir proteção contra a doença meningocócica causada pelo sorogrupo B, desde o final da década de 1990, Bio-Manguinhos desenvolveu uma vacina brasileira contra este microrganismo. O desenvolvimento desta vacina seguiu o conceito *tailor made* em que o produto é desenvolvido para um quadro epidemiológico específico. Na ocasião do início do projeto de desenvolvimento da vacina, o sorogrupo B era responsável por 40% dos casos de meningite meningocócica notificados no país. A vacina desenvolvida é composta de antígenos de duas cepas de maior prevalência no Brasil. A primeira delas é a cepa B:4,7:P1.19,15:P5.5,7:L1,3,7,8, conhecida como N44/89, e a segunda B:4:P1.7,1:P5.5,7:L3,7, conhecida como N603/95 (Barroso *et al.*, 2009; Lemos *et al.*, 2006).

As VMEs das duas cepas são obtidas e purificadas em condições de deficiência de ferro, mimetizando a condição que o microrganismo enfrentaria no organismo humano. Além destes antígenos, foi incluído na preparação o LOS destoxificado (dLOS) da primeira cepa prevalente, N44/89. Este antígeno foi introduzido com o objetivo de aumentar a cobertura vacinal uma vez que esta

molécula tem expressão em cepas com diferentes sorosubtipos e mesmo em diferentes sorogrupos.

Foram testadas três vacinas durante o estudo clínico de fase I, com diferentes concentrações de VME por dose: 12,5µg, 25µg e 50µg. A concentração de dLOS nas formulações foi sempre o equivalente à metade da dose de VME. O uso destas vacinas em adultos, demonstrou a segurança das mesmas, o que definiu sua utilização em crianças para avaliação de imunogenicidade. Entre 2012 e 2014 as três concentrações de vacinas foram testadas em crianças de 4 a 11 anos, em esquema vacinal de três doses com reforço após 6 a 12 meses, para avaliação de imunogenicidade e segurança.

As vacinas teste se mostraram seguras e imunogênicas para as cepas vacinais e duas cepas B heterólogas pelo ensaio SBA (atividade bactericida do soro). Os títulos protetores foram significativamente maiores para a 1ª cepa vacinal B:4,7:P1,19,15:P5.5,7:L1,3,7,8 do que para a segunda cepa B:4:P1.7,1:P5.5,7:L3,7 com resposta reforço apenas para a 1ª cepa. Embora tenham sido observados títulos protetores para as cepas heterólogas testadas, os títulos foram muito inferiores àqueles obtidos para as cepas vacinais. Não se observou resposta reforço para as cepas heterólogas. A dose reforço se mostrou importante na manutenção dos títulos protetores para todas as cepas testadas.

Apesar de a vacina desenvolvida atender à situação epidemiológica da doença meningocócica causada pelo sorogrupo B no país, a atual diminuição da doença causada por este sorogrupo no Brasil, definiu a opção de Bio-Manguinhos de interromper o projeto e não avançar no registro da nova vacina junto a ANVISA. No entanto, de acordo com a tendência mundial de utilização de vacinas multivalentes combinadas existe a possibilidade do emprego do produto desenvolvido como futuro componente de uma vacina múltipla contra o meningococo.

3.7 Vacina Meningocócica C Conjugada Brasileira

Motivado pelo quadro epidemiológico brasileiro e pela larga experiência na produção de vacinas polissacarídicas contra meningococos, Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina meningocócica C conjugada brasileira, desde 2000. A vacina conjugada é obtida pelo método modificado de aaminação redutiva entre o polissacarídeo C e o toxóide tetânico (TT) (Silveira *et al.*, 2007). Em etapas anteriores, foram realizadas a caracterização físico-química, biológica e a avaliação imunológica dos conjugados, obtidos em diferentes escalas, utilizando-se o método modificado de aaminação redutiva e etapas de purificação, que envolvem componentes de inovação tecnológica (Bastos 2005; Jessouroun *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2007; Rodrigues 2009; Bastos *et al.*, 2010). A vacina conjugada apresentou resultados satisfatórios de reatogenicidade e imunogenicidade em indivíduos saudáveis, em estudos clínicos de fase I realizados em 2009, em comparação com uma vacina comercial e a fase II do estudo clínico foi finalizado no segundo semestre de 2012 em crianças de 1 a 9 anos de idade. A fase III está prevista para o primeiro semestre de 2016.

Na produção deste tipo de vacina são utilizadas diferentes tecnologias de ponta para a obtenção de produtos com alto valor agregado, empregando-se grande investimento na capacitação pessoal, em diferentes áreas. Bio-Manguinhos é a primeira instituição brasileira com iniciativa na área de desenvolvimento de vacinas, o que traz a perspectiva de grande avanço ao desenvolvimento tecnológico do país que normalmente utiliza vacinas com alto custo, obtidas por contratos de transferência de tecnologias estrangeiras para suprir o Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde.

Em função do grande número de casos de DM causada pelo grupo C atualmente no país, em outubro de 2010, o PNI introduziu, no calendário de vacinações, a vacina C conjugada produzida pela FUNED a partir de transferência de tecnologia de produção da Novartis. A vacina está indicada para crianças menores de 2 anos de idade. Entretanto, existe uma demanda nacional de 80 milhões de doses para a proteção de milhares de crianças, adolescentes e adultos jovens brasileiros (com idade entre 2 meses e 20 anos), contra a infecção causada pela bactéria. Esta demanda justifica, no futuro, a utilização de vacinas produzidas

em dois laboratórios, com o objetivo de assegurar o fornecimento contínuo do imunobiológico à população. Desta forma, após a conclusão dos estudos clínicos com a nova vacina conjugada, empregando-se tecnologia desenvolvida no país, Bio-Manguinhos poderá obter o registro para a produção e comercialização da vacina.

3.8 Vacinas Combinadas

As vacinas combinadas permitem a redução do número de imunizações necessárias para assegurar a proteção contra múltiplas doenças. Diminuindo, assim, o número de visitas aos órgãos de saúde e os gastos com a administração de vacinas. O grande desafio na combinação de vacinas é manter uma resposta imunológica tão eficaz quanto a da vacina aplicada separadamente (Dagan, 2005).

Historicamente, a co-administração de vacinas com o intuito de imunizar simultaneamente contra múltiplos patógenos foi motivada por um número de fatores na prática clínica e pelos avanços no *design* de vacinas conjugadas. Esses fatores incluíam a necessidade de aplicar certos tipos de imunizações em determinadas faixas etárias, a sobreposição epidemiológica de certas infecções, compatibilidade e estabilidade das vacinas, considerações de segurança, benefícios imunológicos, entre outros (Lgietseme *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2010).

Vacinas múltiplas podem ser administradas na forma combinada ou associada. Na vacinação combinada, dois ou mais agentes são administrados numa mesma preparação (por exemplo, vacina tríplice DTP, vacinas duplas DT e dT e vacina oral trivalente contra a poliomielite, que contém os três tipos de vírus atenuados da poliomielite). Na vacinação associada, misturam-se as vacinas no momento da aplicação, o que pode ser feito, por exemplo, entre determinadas apresentações das vacinas contra *Haemophilus influenzae* b e a vacina tríplice DTP.

Com o objetivo de produzir uma vacina com a maior cobertura vacinal entre os sorotipos, foram desenvolvidas vacinas multivalentes conjugadas incorporando os polissacarídeos dos grupos A, C, Y e W. Essas vacinas meningocócicas conjugadas multivalente e polissacarídicas estão licenciadas em diversos países.

Estudos que avaliaram a imunogenicidade em longo prazo das vacinas conjugadas revelaram queda dos títulos de SBA a níveis abaixo dos correlacionados à proteção poucos anos após a imunização de crianças. Essa perda de

soroproteção foi verificada tanto em lactentes, que receberam três doses da vacina no primeiro ano de vida, como em pré-escolares que receberam apenas uma dose da vacina. Os estudos também demonstraram que a queda de anticorpos foi observada com todas as vacinas conjugadas meningocócicas, apesar de ter sido menos acentuada com a vacina conjugada ao toxóide tetânico do que com as vacinas conjugadas ao mutante diftérico (Sáfadi & Barros, 2006).

Esse fato motivou a alteração do esquema de uso dessas vacinas, com o intuito de proporcionar uma proteção mais duradoura, incorporando uma dose reforço após 1 ano de idade nas crianças imunizadas na rotina com duas ou três doses nos primeiros meses de vida.

A partir do desenvolvimento das vacinas contra o sorogrupo B foi percebido o poder adjuvante de algumas estruturas presente nesse microrganismo. (Verheul *et al.*, 1993). Assim esses componentes poderiam contribuir, em uma formulação combinada, para o desenvolvimento de novas vacinas meningocócicas multivalentes, que promovam uma memória imunológica duradoura.

Os adjuvantes podem ampliar a imunização e a utilização de melhores adjuvantes pode vir a ser a chave para o êxito do desenvolvimento de vacinas com proteção ampliada para o sorogrupo B. Os adjuvantes atualmente autorizados para utilização humana incluem sais de alumínio, monofosforil-lípido A (MPL), emulsões de óleo/água, e lipossomas (Rappuoli *et al.*, 2011). Até agora, os sais de alumínio têm sido empregados na maioria das vacinas meningocócicas. No entanto, sais de alumínio são os adjuvantes fracos em muitas situações, em especial quando uma resposta imune celular é necessária, uma vez que principalmente induz uma resposta Th2 (Nagapura *et al.*, 2014).

Os sais de alumínio em vacinas compostas por VME podem contribuir para redução da toxicidade do LOS associado. O LOS tem sido sugerido como um adjuvante alternativo em vacinas meningocócicas futuras e também podem agir como um antígeno em potencial. Atua como um adjuvante forte e já foi demonstrado que direciona a resposta de células T no sentido de uma imunidade de tipo Th1, o que pode ser importante para a proteção contra a doença meningocócica (Nagapura *et al.*, 2014).

Desta forma a vacina B, poderia contribuir numa formulação combinada de forma diferente do hidróxido de alumínio (Meht *et al.*, 2014).

3.9 Origem e Importância de Bio-Manguinhos

A origem de Bio-Manguinhos, antes denominado Instituto Soroterápico Federal, se confunde com a história de combate a epidemias de grande impacto para a saúde pública brasileira e com o reconhecimento, por parte das instâncias governamentais, da necessidade de criar e fortalecer a produção de vacinas no país (Homma *et al.*, 2005; Homma, 2009).

A grande epidemia de meningite meningocócica causada pelos sorogrupos A e C, na década de 1970, causou centenas de mortes e encontrou o país completamente despreparado para enfrentar essa dramática situação. Para o suprimento de vacina contra a doença, o governo brasileiro buscou o Instituto Mérieux na França que produziu, em operação emergencial, 80 milhões de doses, utilizadas para vacinação em massa da população brasileira. Devido a esse fato, em 1975 foi criada a planta piloto de vacinas bacterianas, na qual recebeu a transferência de tecnologia do instituto (Homma *et al.*, 2005; Khatami & Pollard, 2010).

Ocorre, então, a decisão do governo federal de fortalecer a capacitação tecnológica nacional de produção de imunobiológicos essenciais e estratégicos para a saúde pública, com instalações apropriadas e incorporação de tecnologias contemporâneas. Nesse contexto, foi criado, em 4 de maio de 1976, pela Norma Regulamentar 02/76 do presidente da Fundação Oswaldo Cruz, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), que incorpora as atividades tecnológicas desenvolvidas até então pelo Instituto Oswaldo Cruz herdando, portanto, as funções e atividades do antigo Instituto Soroterápico Federal (Homma *et al.*, 2005).

Porém, a evolução de Bio-Manguinhos vem ocorrendo de tal modo que possa enfrentar os desafios para atender as novas demandas geradas pelo quadro epidemiológico nacional e os avanços científicos e tecnológicos da área. Hoje, este instituto, é uma importante indústria na produção de vacinas para uso em seres humano, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos, sendo atualmente o maior fornecedor de imunobiológicos do Ministério da Saúde, suprimindo 47% da demanda de vacinas do PNI. Produz mais de 100 milhões de doses anuais em forma de concentrado viral e cerca de 60 milhões de doses de vacina formulada para atender ao PNI e as Agências das Nações Unidas. São produzidas em Bio-

manguinhos vacinas contra poliomielite, febre amarela, DTP, Hib, meningites A e C, sarampo, rubéola e caxumba (Bio-Manguinhos, 2007; Homma *et al.*, 2011).

No início da década de 1990, considerando o quadro epidemiológico brasileiro, Bio-Manguinhos iniciou o desenvolvimento de vacinas contra doenças meningocócicas, as quais têm como principal agente etiológico a *N. meningitidis* dos sorogrupos B e C. Essas duas vacinas passaram pelas fases I e II do ensaio clínico em adultos e crianças, e as mesmas foram finalizadas com sucesso.

A vacina meningocócica C conjugada seguirá para fase III do ensaio clínico, em crianças até 2 anos, em 2016, correspondente à última etapa de estudos clínicos em seres humanos para registro dos produtos na ANVISA. No entanto, o último estudo clínico a ser realizado para a finalização do desenvolvimento da vacina meningocócica B foi suspenso por questões institucionais, justificado pela baixa incidência da doença no país por este sorogrupo.

De acordo com a demanda do Ministério da Saúde que se baseia no quadro epidemiológico da DM no país, uma vacina combinada contra os sorogrupos prevalentes, B e C, seria de interesse para o Programa Nacional de Imunizações. Os resultados promissores de segurança e imunogenicidade das duas vacinas desenvolvidas por Bio-Manguinhos têm subsidiado os estudos pré-clínicos da combinação das duas vacinas experimentais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades experimentais desenvolvidas neste estudo estão delineadas nos fluxograma apresentado na **Figura 8** e apresentadas em detalhe nos itens que se seguem.

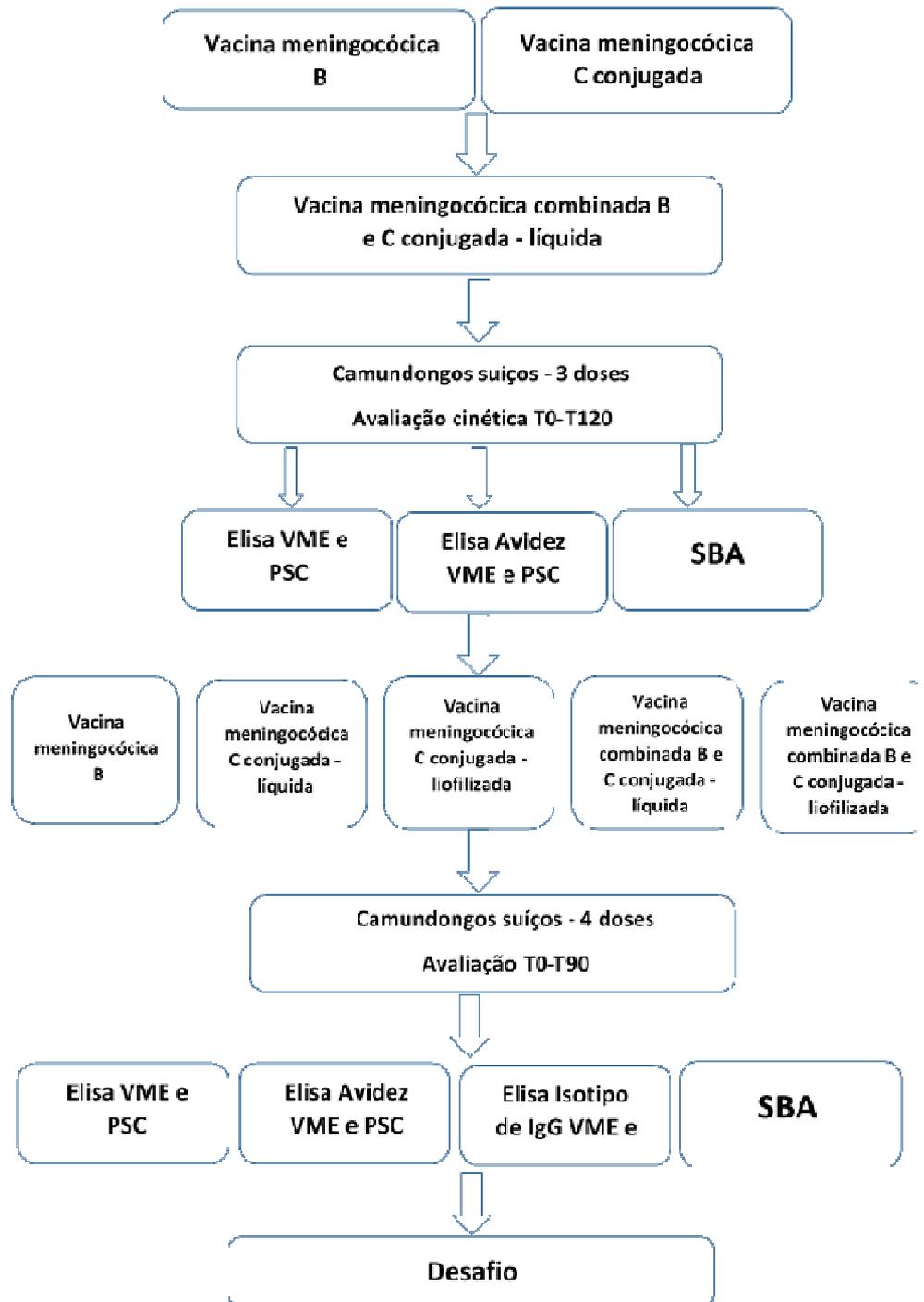


Figura 7. Fluxograma de atividades.

4.1 Antígenos Vacinais

4.1.1 Obtenção das VMEs

As cepas de *N. meningitidis* utilizadas para na produção dos antígenos da vacina meningocócica B foram selecionadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) em São Paulo, com base na prevalência do país. As cepa N44/89 (B:4,7:P1.19,15:P5.5,7:L1,3,7,8) é o principal sorosubtipo causador de doença meningocócica, no Brasil, pelo sorogrupo B desde a década de 90 (Barroso *et al.*, 2010). A segunda prevalente na época do desenvolvimento da vacina é cepa a N603/95(B:4:P1,7,7:P5.5,7:L3,7). Ambas foram isoladas de material clínico, caracterizadas e enviadas a Bio-Manguinhos liofilizadas. Estas cepas liofilizadas foram utilizadas para dar origem a lotes sementes mãe e trabalho, congelados e estocados a -70 °C. O lote trabalho foi empregado nos processos fermentativos para obtenção dos antígenos vacinais.

Para a produção das VMEs, as cepas N44/89 e N603/95, oriundas do lote trabalho, foram cultivadas por 16 horas em ágar TSB (meio composto por produtos de origem não animal) a 37 °C por 16 horas em atmosfera de aproximadamente 5 % CO₂ e em seguida transferida para meio de Catlin (1973).

1º Pré-cultivo: A biomassa obtida de cultivo em meio sólido foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 mL de meio de Catlin com 10 µM Fe⁺³ e este foi incubado sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C por 4 h. A concentração inicial de células foi padronizada através da densidade ótica com leitura em 600 nm na faixa de 0,300 a 0,500.

2º Pré-cultivo: Após as 4 horas de incubação, o conteúdo total proveniente do 1º pré-cultivo foi transferido (10% v/v) para um biorreator com volume útil de 10 litros contendo 9 litros do mesmo meio de cultivo para propagação do crescimento a 37 °C por 4 h em pH 7,0 (controlado pela adição de NaOH 5M e H₃PO₄ 3M) e pO₂ = 30% (aeração superficial).

Cultivo final: O volume total obtido no 2º pré-cultivo foi transferido para o biorreator (10% v/v) com volume útil de 100 L contendo 90 L de meio de Catlin adicionado de 42 µM de EDDHA, 20 µM de Fe⁺³. O processo de cultivo no biorreator foi realizado a

temperatura de 37 °C por 12 horas em pH 7,0 (controlado pela adição de NaOH 5M e H₃PO₄ 3M) usando $K_{La} = 22,5h^{-1}$ (aeração superficial).

Após o período de crescimento o cultivo foi inativado (56°C/30 min) e a separação da biomassa foi feita através de centrifugação de fluxo contínuo. O sobrenadante obtido foi concentrado por ultrafiltração tangencial utilizando membrana de 100 kDa.

O material filtrado (aproximadamente 4 litros) foi centrifugado a 24.000 x g por 2 h a 4 °C para a primeira retirada de debris celulares. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 24.000 x g por 90 min a 4 °C para extração final dos debris. O sobrenadante final foi recolhido para concentração das VMEs não purificadas.

Esse material foi submetido a ultracentrifugação a 100.000 xg por 2 h, sendo o sobrenadante descartado, o sedimento ressuspense em água milli-Q e sonicado por 20 min com pérolas de vidro em banho de gelo, esta suspensão é denominada de VME não purificada (VME NP).

A VME NP foi ultracentrifugada (100.000 x g por 2 h a 4 °C) duas vezes com tampão contendo DOC para extração de LOS, sendo o sedimento ressuspense com água apirogênica (100 mL) e submetido a banho de ultrassom com pérolas de vidro e gelo, esta suspensão é denominada VME purificada.

Após quantificação do conteúdo de proteína e ajuste da concentração em torno de 1,5 mg proteína/mL a suspensão de VMEs purificada foi esterilizada por filtração empregando membrana de 0,2µm, (MILLIPAK200) acondicionada em frasco estéril e apirogênico (Frasch, 1995).

4.1.2 Obtenção e destoxificação do LOS

Para a obtenção de LOS destoxificado (dLOS), a cepa N44/89 foi cultivada em biorreator de 100L como o descrito para a obtenção de VMEs, porém empregando-se o meio de Catlin contendo 20 µM Fe⁺³, em todas as etapas. As condições de cultivo foram as mesmas, exceto o tempo de cultivo que foi de 8 horas.

Após o tempo de incubação e inativação, nas mesmas condições descritas para produção de VMES, foi adicionado ao cultivo Cetavlon® (brometo de hexadecil

trimetilamônio quaternário) na concentração de 0,2%. O precipitado foi coletado por centrifugação em centrífuga de fluxo contínuo. O Cetavlon® é um detergente catiônico que precipita todas as moléculas negativas, entre elas o LOS.

A biomassa precipitada foi ressuspensa em água destilada adicionada de cloreto de cálcio na concentração final de 1M e deixada sob agitação por 30 minutos. Após extração das OMVs por ultrafiltração após tratamento com DOC (Tsai *et al.*, 1989). O LOS foi isolado por sucessivas extrações usando tampão de 40 mM Tris-HCl, pH 8,5; contendo 1% de desoxicolato de sódio (DOC) e 4 mM de EDTA.

O LOS extraído foi purificado utilizando coluna Sephacryl HR S-300 com 0,5 % de DOC e precipitado a – 20° C com Etanol e 0,25 M de NaCl. O LOS purificado foi detoxificado com 0,25 N de hidróxido de sódio (NaOH) por 60 minutos a 60°C. Após o intervalo de detoxificação, as amostras foram neutralizadas com 0,25 N de ácido clorídrico (HCl). A suspensão foi precipitada com 75% de etanol absoluto *overnight* e o LOS precipitado coletado por centrifugação e o sedimento liofilizado.

4.2 Vacina Meningocócica B

A vacina brasileira contra o meningococo B foi obtida a partir da combinação das VMEs das duas cepas prevalentes no país (N44/89 e N603/95), referidas como cepas vacinais, e dLOS daquela de maior prevalência (N44/89), na proporção antigênica 1:1:1. Na formulação da vacina empregou-se 25 µg de proteínas de cada uma das VMEs obtidas e também do dLOS. Os antígenos vacinais foram adsorvidos em 2 mg de Hidróxido de Alumínio por dose de vacina. A dose humana é de 0,5 mL e a dose experimental para os ensaios em camundongos foi 1/10 da dose humana por via intramuscular. Nos experimentos realizados, neste estudo, foi utilizada a vacina produzida para o estudo clínico de fase II para avaliação de imunogenicidade e reatogenicidade (Lote 129EXVME03) em crianças de 4 a 11 anos.

4.3 Vacina Meningocócica C Conjugada

A vacina brasileira meningocócica C conjugada foi obtida utilizando o método de conjugação entre o polissacarídeo meningocócico C e toxóide tetânico da aaminação redutiva modificada (Silveira *et al.*, 2007). O polissacarídeo do grupo C (PSC) utilizado na produção da vacina conjugada C foi produzido pelo Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB / Bio-Manguinhos) a partir de cultura da cepa vacinal 2135 de *N. meningitidis*, purificado e controlado de acordo com os procedimentos descritos para produção de vacina meningocócica (Gotschlich *et al.*, 1969) e com os Requerimentos da OMS (WHO, 1981). Posteriormente, o PSC nativo foi modificado quimicamente, antes do processo de conjugação pela reação de oxidação com periodato de sódio (23,4 mM) a 4°C durante 17h, onde ocorreu a introdução de aldeídos terminais e a redução do tamanho da molécula (Jennings e Lugowski, 1981). Após a reação de oxidação, o polissacarídeo oxidado (PSC-oxi) foi purificado e concentrado, conforme descrito anteriormente (Jessouron *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2007).

A anatoxina tetânica (TT) foi produzida, destoxificada, purificada e controlada através de procedimentos descritos nos Requerimentos da OMS (WHO, 1990), pelo Instituto Butantan, São Paulo/SP. O lote de TT utilizado tem a pureza antigênica igual a 1.666,6 Limite de floculação (Lf)/mg Nitrogênio protéico, que é um valor apropriado para ser utilizado no processo de conjugação do polissacarídeo meningocócico do grupo C, desde que a OMS preconiza um valor superior a 1.500 Lf/ Nitrogênio protéico (WHO, 2004).

O TT foi ativado pela introdução de grupos hidrazida, através da metodologia da carbodiimida (EDAC), após tratamento com cloridrato de hidrazina à temperatura ambiente e sob condições ácidas (pH 6,1) (Lee & Frasch, 2005). A anatoxina tetânica ativada (TTH) foi purificada pelo processo de diafiltração e concentrada através de filtração tangencial (Jessouron *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2007).

Os conjugados (PSC-TT) foram obtidos através da ligação covalente entre os aldeídos gerados no polissacarídeo ativado e os grupamentos hidrazida da proteína em presença de cianoborohidreto de sódio, como agente redutor (método derivado da técnica de aaminação redutiva descrita por Jennings e Lugowski, 1981). Após bloqueio dos grupos funcionais que não reagiram, os conjugados foram purificados pelo processo de diafiltração contra PBS 0,02 M e concentrado por ultrafiltração

tangencial (Sistema Centramate – Pall BioPharmaceuticals; Jessouroun *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2007). Este método foi aplicado para remoção do componente sacarídico livre e dos reagentes residuais usados no processo de conjugação (WHO 2004; Jódar *et al* 2004).

Esses conjugados foram utilizados na formulação da vacina, sendo posteriormente envasada e liofilizada.

A vacina C conjugada monovalente liofilizada, utilizada neste estudo foi a produzida para o estudo de fase II de imunogenicidade e reatogenicidade em crianças (Lote 138EXVMC03). Neste caso a vacina foi ressuspensa no seu diluente no momento da administração nos animais.

4.4 Vacinas Experimentais

A vacina meningocócica B desenvolvida em Bio-Manguinhos e utilizada nos estudos clínicos de fase II em crianças de 4 a 11 anos, tem seus antígenos adsorvidos em hidróxido de alumínio. Desta forma, sua apresentação é líquida. Convencionamos chamar esta vacina de Vacina meningocócica B. Já a vacina C conjugada, desenvolvida em Bio-Manguinhos e utilizada no estudo de fase II, é liofilizada e ressuspensa em hidróxido de alumínio no momento da administração. Convencionamos chamá-la de Vacina C conjugada liofilizada, neste estudo. Para aplicação neste estudo a Vacina C conjugada foi formulada diretamente ao hidróxido de alumínio. Esta preparação foi chamada de vacina C conjugada líquida.

Em todas as formulações foi utilizado hidróxido de alumínio (ALHYDROGEL, Lote: 4765, Validade: Maio/2014) na concentração de 10100 $\mu\text{g Al}^{+3}/\text{mL}$.

No primeiro bloco de atividades foi utilizada a Vacina combinada meningocócica C conjugada e meningocócica B na apresentação líquida.

Formulação Vacinal:

VMEs (N44/89; Lote 11UMBVAEX03 + N603/90; Lote 121MBVBEX01) + Hidróxido de Alumínio + dLOS (Lote 123MBLDEX10) + Conjugado PSC-TT (Lote ESC 05/12)

Concentração desejada do antígeno:

VMEs: 5 μg / 0,2 mL

dLOS: 2,5 μg / 0,2 mL

Conjugado PSC-TT: 1,0 μg /0,2 mL

Com a perspectiva de estudo da administração de uma dose reforço, um segundo bloco de atividades foi proposto utilizando as seguintes formulações:

VACINA 1: Vacina Meningocócica B lote 129EXVME03. Utilizada no estudo clínico de fase II em crianças de 4 a 11 anos de idade.

VACINA 2: Vacina Meningocócica C Conjugada + HA – apresentação líquida
Formulação Vacinal: Conjugado PSC-TT (Lote ESC 05/12)+Hidróxido de Alumínio.

Concentração açúcar: 1,09 mg/mL

Concentração desejada do antígeno conjugado: 1,0µg/0,2 mL

Concentração por dose: 35 µg Al⁺³/0,2 mL

VACINA 3: Vacina Meningocócica C Conjugada lote 138EXVMC03. Utilizada no estudo clínico fase II em crianças de 1 a 9 anos de idade, ressuspensa no diluente (Hidróxido de Alumínio) lote 134EXDMC01

VACINA 4: Vacina Meningocócica combinada C conjugada e meningocócica B – apresentação líquida

Formulação Vacinal: VMEs (N44/89; Lote 11UMBVAEX03 + N603/90; Lote 121MBVBEX01) + Hidróxido de Alumínio + dLOS (Lote 123MBLDEX10) +

Conjugado PSC-TT (Lote ESC 05/12)

Concentração desejada do antígeno:

VMEs: 5 µg / 0,2 mL

dLOS: 2,5 µg / 0,2 mL

Conjugado PSC-TT: 1,0 µg/0,2 mL

Concentração por dose: 35 µg Al⁺³/0,2 mL

VACINA 5: Vacina Meningocócica C Conjugada lote 138EXVMC03. Utilizada no estudo clínico fase II em crianças de 1 a 9 anos de idade, ressuspensa na Vacina Meningocócica B lote 129EXVME03. Utilizada no estudo clínico de fase II em crianças de 4 a 11 anos de idade.

4.5 Ensaios em Animais

As formulações utilizadas para a imunização dos animais foram divididas em grupos, e este padrão foi mantido em todos os experimentos realizados. Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL, antigo COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ para experimentação animal (nº LW-06/10). A licença para o uso dos animais em experimentos realizados no LAEAN (Laboratório de Experimentação Animal) foi registrada no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ) sob o número P. 0135/02.

Nos diferentes experimentos, camundongos suíços, de ambos os sexos, com peso entre 12 a 17 gramas foram divididos em grupos e imunizados por via intramuscular com 0,2 mL das formulações. As concentrações dos componentes vacinais administrados nos animais corresponderam a 1:10 da dosagem aplicada em humanos. Os camundongos imunizados foram separados em grupos de 5 animais por caixa.

No primeiro bloco de atividades com o objetivo de avaliar preliminarmente a cinética da resposta induzida pela combinação das duas vacinas o esquema vacinal foi realizado em três doses num intervalo de 15 dias entre elas, as coletas sanguíneas foram realizadas de acordo com a descrição abaixo:

- Experimento 1: coleta de amostras de sangue antes da imunização (T0); antes da 2ª imunização (T15); antes da 3ª imunização (T30), 15 dias após 3ª dose (T45), 30 dias após 3ª dose (T60); 45 dias após 3ª dose (T75), 60 dias após 3ª dose (T90), 75 dias após 3ª dose (T105) e 90 dias após 3ª dose (T120).

Com o momento da dose reforço estabelecido, foi proposto um novo grupo de atividades para a avaliação da resposta após a dose reforço. Neste momento 150 camundongos suíços foram imunizados com diferentes formulações das vacinas meningocócicas C conjugada e meningocócica B, isoladamente e combinadas entre elas, em apresentações, líquida e liofilizada.

Os camundongos foram separados em 5 grupos com 30 animais cada, utilizando as vacinas formuladas descritas na seção 3.4 (**Tabela 1**).

Tabela 1 Formulações vacinais utilizadas no segundo bloco de experimentos

GRUPOS	FORMULAÇÕES
1	VACINA 1
2	VACINA 2
3	VACINA 3
4	VACINA 4
5	VACINA 5

Nesse experimento as coletas sanguíneas foram realizadas de acordo com a descrição abaixo:

- Experimento 2: Foram coletadas amostras sanguíneas antes da imunização (T0); antes da dose reforço (T60); 15 dias após a dose reforço (T75) e 1 mês após dose reforço (T90).

Os animais dos grupos 1 ao grupo 5 foram desafiados com as cepas N44/89, N603/95 e 2625 (sorogrupo B); e 2135 (sorogrupo C). Os animais sobreviventes ao desafio foram sangrados após 30 dias.

As sangrias foram realizadas via plexo orbital sob anestesia local. Os tubos com gel separador contendo o sangue coletado foram submetidos a centrifugação a 3.000 rpm durante 20 minutos para obtenção do soro. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em microtubos e o soro separado e armazenado a -20°C.

4.6 Ensaio de Atividade Bactericida dos Anticorpos

Preparo da suspensão bacteriana: a bactéria alvo foi semeada em ágar Columbia contendo 5% de sangue equino por 18 a 24h a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Após o tempo de incubação foram selecionadas de 5 a 10 colônias isoladas, que em conjunto foram semeadas por esgotamento em Agar Columbia por 4 horas nas mesmas condições da incubação anterior. O cultivo obtido foi ressuspenso em solução de Hanks e a concentração bacteriana ajustada de forma a conter de 100 a 130 colônias em 10 µL.

Preparo dos soros para o teste: Após inativação a 56°C/30 minutos soros de animais imunizados com as diferentes preparações teste foram diluídos (fator 2) em placa de 96 cavidades, da coluna 1 a 9, utilizando solução de Hanks em volume final de 20 µL.

Fonte de complemento exógena: Para cepas de *N. meningitidis* sorogrupos B e C empregou-se plasma humano como fonte de complemento (Conselho de Ética do Hemorio número do CEP 118-07, terceiro adendo aprovado em 08/04/2013).

Descrição do teste: após a diluição dos soros, adicionou-se, a cada um dos poços (coluna 1 a 9), 10 µL da suspensão bacteriana alvo e 10 µL da fonte de complemento (25% do volume final no poço). Na coluna 10 (controle do complemento), foram colocados 20 µL de Hanks, 10 µL de suspensão bacteriana e 10 µL de complemento. Na coluna 11 (referência da suspensão bacteriana alvo) foi adicionado 20 µL de Hanks, 10 µL de suspensão bacteriana e 10 µL de complemento inativado (56°C/30 min). Na coluna 12 (controle do soro) foi adicionado 10 µL de Hanks, 20 µL do soro teste e 10 µL de suspensão bacteriana. Após suave homogeneização, as placas de 96 cavidades foram incubadas em estufa a 37°C por 60 min. Posteriormente, 10 µL de cada poço foi semeado por gota pendente em agar Columbia contendo 5% de sangue equino. As placas semeadas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ por 18 a 20 horas. Após o tempo de incubação, as colônias obtidas foram contadas automaticamente, empregando-se o programa Image-Pro Plus. Os títulos de atividade bactericida dos soros teste foram expressos como a recíproca da diluição capaz de induzir 50% de lise bacteriana, quando comparado ao número de células viáveis presentes nos poços da coluna 11, contendo complemento inativado e sem soro, após 60 minutos de incubação (Zollinger & Mandrell, 1983). O procedimento descrito foi adotado para as cepas de *N.*

meningitidis do sorogrupo B N44/89 e N603/95 (vacinais) e heterólogas (2625 e 2634). Para o sorogrupo C foram empregadas as cepas C11 e 2631 (vacinal).

4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

4.7.1 Elisa para detecção de anticorpos anti-VME de *N. meningitidis* grupo B

A detecção dos títulos de IgG total dos soros dos animais imunizados com as vacinas propostas foram analisados por teste de ELISA para os antígenos vacinais conforme descrito no trabalho de Rosenqvist e colaboradores (1991). Placas de poliestireno de 96 poços (Corning Costar – placa de natureza hidrofóbica que liga biomoléculas por meio de interação passiva) foram sensibilizadas com 4 µg/poço de uma solução contendo VME das cepas N44/89 ou N603/95, diluídas em tampão de sensibilização (Tris/HCl 0,1 M pH 8,5). Estas placas foram incubadas em câmara úmida por aproximadamente 16 horas a 37°C ou até por 10 dias após sua preparação (mantidas a 4°C). No dia seguinte, foram adicionados 200 µL/poço do tampão de bloqueio (TBS-SFB 5%) e, em câmara úmida, incubadas por 1 hora a 37°C. As amostras testadas foram diluídas de acordo com a vacina inoculada, de 1:200 a 1:32000, e o soro padrão, a 1:5000, ambos em tampão de diluição (TBS-SFB 5%), foram adicionados as placas e diluídos seriadamente. As placas permaneceram em câmara úmida a 4°C por 16 horas. Após esse período, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído na proporção 1:2000 e as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço da solução do substrato para a enzima fosfatase alcalina (p-nitrofenil fosfatase) (Sigma-Aldrich) diluída em tampão do substrato (TrisBase 1M pH 9,8) e, após 30 minutos foi realizada a leitura da densidade óptica de cada amostra, utilizando leitora de microplacas (VERSAmax tunable *microplate reader*) no comprimento de onda 405 nm. A concentração de IgG total nos soros (EU/mL) foi calculada utilizando a curva logística de 4 parâmetros (4PL) no software SoftMax-Pro. Entre cada etapa, foram realizadas lavagens com tampão TBS acrescido de

0,05% Tween 20. Essas lavagens foram realizadas 4 vezes em lavadora automática (Skan Washer version B – Molecular Devices) e utilizando 200µL do tampão por orifício da placa.

4.7.2 Elisa para detecção de anticorpo contra o polissacarídeo de *N. meningitidis* grupo C

Conforme descrito por Gheesling e colaboradores (1994) e Rosenqvist e colaboradores (2001), os soros dos animais imunizados foram utilizados para quantificação de anticorpos contra o polissacarídeo C (PSC). Placas de poliestireno de 96 poços (Imm lux HB / Dynex - REF 1010 - placa com afinidade por complexos hidrofílicos e proteínas) foram sensibilizadas com 100 µL/poço com uma solução contendo 10 µg/poço de polissacarídeo C e albumina humana metilada (NIBSC). A placa foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem, foram adicionados 200 µL/poço da solução de bloqueio (TBS acrescido de 5% de soro fetal bovino, 0,05% de Tween 20) e a placa foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, as amostras e o soro padrão foram diluídos seriadamente, na própria placa, com tampão de diluição (TBS-SFB 5%) e, posteriormente incubadas a 4°C por aproximadamente 16h em câmara úmida. Após essa etapa, foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-IgG murino (*whole molecule*) conjugado a enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído em tampão de diluição (1:3000) e, em sequência, as placas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas a temperatura ambiente. Na última etapa, foram adicionados 100 µL/poço da solução do substrato, contendo 1 mg/ml de fosfatase alcalina, seguido de acondicionamento à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 min. A densidade óptica de cada amostra foi obtida através da leitora (VERSAmax tunable microplate reader) a partir de um comprimento de onda 405 nm. As concentrações (EU/mL) foram calculadas utilizando a curva logística de 4 parâmetros (4PL) no software SoftMax-Pro. Entre cada etapa foi realizada uma lavagem com tampão TBS pH 7,5 acrescido de 0,05% de Tween 20 em lavadora automática (SkanWasher 300 versão B Molecular Device) com 200 µL/poço.

4.7.3 Índice de avides

A avides de anticorpos anti-IgG específicos de diferentes vacinas foi estudada utilizando o método de eluição com o tiocianato de amônio (NH_4SCN), como agente desnaturante capaz de dissociar 50% dos complexos antígeno-anticorpo (Ag-Ac) de baixa afinidade, de acordo com Goldblatt (1997). As microplacas revestidas com 4 $\mu\text{g/mL}$ de VMEs ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de complexo MenPSC-AHM foram incubadas com uma diluição pré-determinada das amostras de soro, capaz de induzir uma absorbância de 0,8 a 1,0, durante 16h a 4°C. Para cada soro diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,5M) foram adicionadas. As placas foram então incubadas por 15 min à temperatura ambiente, seguida por um ciclo de lavagem. O restante do ensaio foi desenvolvido como descrito para a detecção de IgG total (item 4.7.2). Segundo Goldblatt (1997) e Silveira (2007) a concentração de NH_4SCN necessária para reduzir a absorbância em 50%, representa o índice de avides, calculado conforme descrito na equação 1.

$$AI = \frac{(\log 50 - \log A) \times (B - A)}{\log B - \log A} + A \quad \text{Equação 1}$$

Onde,

AI = Índice de Avides

log de 50 = 1,70

A = concentração de tiocianato de amônio capaz de promover uma redução da absorbância inferior a 50%

B = concentração de tiocianato de amônio capaz de promover uma redução superior a 50%

4.7.4 Determinação dos isotipos de IgG

A determinação dos títulos de anticorpos pertencentes aos diferentes isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), induzidos contra os antígenos vacinais, foi realizada por testes imunoenzimáticos (ELISA) em duas etapas.

Primeiramente, foram realizados os testes para quantificar o isotipode IgG, frente a anticorpos totais, induzidos pelas vacinas testes e, a seguir, para determinar o isotipode IgG específico para cada antígeno vacinal, conforme etapas descritas anteriormente para a detecção de IgG total. Para tal, utilizando os isotipos de IgG correspondentes, para a obtenção da curva padrão e anticorpo conjugado à fosfatase alcalina (anti-isotipos de IgG de camundongo obtidos em cabra, Santa Cruz Biothecnology) incubado durante 1h. A placa foi incubada por 45 min e a absorbância foi lida a 405 nm.

Na primeira etapa dos testes, as amostras foram calculadas frente a um padrão de isotipo purificado com concentração conhecida. Na segunda etapa, como não existe um soro padrão com concentração conhecida para os isotipos, optou-se por construir os gráficos utilizando densidade ótica em uma diluição específica do soro (1:1600) para as vacinas teste. Na avaliação estatística dos resultados, foi calculado o coeficiente angular da curva log-log de todos os isotipos.

4.8 Ensaio Desafio

No teste desafio empregado, inicialmente foi determinada a concentração da suspensão bacteriana responsável pela morte de 50% dos animais definida como dose letal 50% (DL50) pelo cálculo de Reed & Muench (1938). Para o preparo da população a ser usada no ensaio de desafio, as cepas alvo foram cultivadas em caldo Casoy por 3 horas (coletadas no meio da fase exponencial de crescimento) a partir de cultivos em Agar Columbia a 37°C por 16-20 h. O cultivo de 3 horas foi centrifugado a 10.000 RPM durante 15 minutos e a concentração bacteriana ajustada para a densidade ótica (DO) de 1,0 em 600nm. Esta suspensão bacteriana ajustada para DO de 1,0 foi diluída em solução de Hanks empregando-se o fator de 10.

Grupos de 15 camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 12 a 17g foram inoculados via intra-muscular na pata traseira, com quatro doses, em intervalos de 15 dias e dose reforço 60 dias após a primeira, das vacinas propostas anteriormente, utilizando hidróxido de alumínio (1 mg/dose) como adjuvante. Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) durante o tempo de experimentação, em torno de 120 dias, e foram submetidos ao ensaio de desafio com as cepas homólogas e heteróloga de *N. meningitidis* grupo B (N44/89, N603/95, 2625) e grupo C (2135), utilizando um modelo de infecção hiperferrêmico (Sifontes *et al.*, 1997). Os animais foram inoculados via intraperitoneal, com 9 mg de ferro-dextran (Sigma) em 0,5 mL de suspensão, imediatamente antes do desafio com 0,5 mL da suspensão bacteriana, também via intraperitoneal.

Para todas as cepas alvo empregou-se o mesmo procedimento e a concentração bacteriana da suspensão desafio obtida para DL50, foi a média aritmética de 3 experimentos. Utilizou-se como dose desafio a população bacteriana correspondente a 1 DL50 (Brodeur *et al.*, 1986; Jessouroun, 2001; Jessouroun *et al.*, 2004).

4.9 Análise Estatística

A significância das diferenças nos níveis de anticorpos entre os grupos, seus títulos de SBA, títulos de IgG e os índices de avides (IAs) dos anticorpos foram comparados para cada componente vacinal pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Normando *et al.* 2010).

Foi utilizado o teste W (Wilcoxon) de Mann-Whitney (Normando *et al.* 2010) para a comparação entre os títulos de IgG total entre os grupos imunizados com as vacinas isoladas e combinada entre elas. O software Graphpad Prism6 foi utilizado em todos os cálculos estatísticos. Os testes estatísticos utilizaram um intervalo de confiança de 95% e o limite para significância estatística foi determinado para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Observação da cinética da resposta humoral induzida pela preparação teste composta da combinação das vacinas B e C conjugada

Para que fossem realizados os estudos comparativos entre as formulações mono e bivalentes, consideramos importante avaliar preliminarmente a cinética da resposta humoral induzida pela combinação das vacinas meningocócicas C conjugada e B, uma vez que tal avaliação com as preparações monovalentes já havia sido realizado nas etapas de desenvolvimento pré-clínico das duas vacinas. O estudo de cinética foi realizado nos camundongos imunizados com a vacina bivalente após 3 doses com intervalo de 15 dias entre elas. Esta avaliação foi realizada pela determinação de IgG total contra as VMEs e contra o polissacarídeo C, avidéz dos anticorpos induzidos e atividade bactericida dos anticorpos frente a cepas vacinais e heteróloga, após 3 doses em imunização primária, para definição do momento da administração da dose reforço. Foram coletadas amostras de sangue dos animais vacinados antes da imunização primária (T0), antes da segunda (T15) e terceira doses (T30), e após a 3ª dose de 15 em 15 dias até 90 dias da última imunização.

5.1.1 Quantificação de anticorpos IgG total para VMEs e PSC pelo método de ELISA

As amostras dos soros dos camundongos imunizados, foram submetidas aos ensaios de quantificação de IgG total específicos e sua avidéz para VMEs e polissacarídeo C, pelo método de ELISA.

Na avaliação da cinética de resposta imune da vacina combinada, pela determinação de IgG total, observamos títulos maiores do que os obtidos em soros pré-ímmunes a partir da 1ª dose de vacina, para os 3 antígenos testados. Os títulos de IgG total aumentaram com as duas doses subsequentes, sendo estatisticamente significante ($p < 0,05$) o aumento dos títulos após a 3ª dose para os 3 componentes vacinais. Observou-se pico de resposta para VME de N44/89 15 dias após a 3ª dose e estabilidade nos títulos até o último tempo de avaliação (T120). Para a VME de

N603/95, o perfil foi o mesmo observado para N44/89, exceto com relação ao pico de resposta que aconteceu 15 dias após a 3ª dose de vacina. A partir do pico de resposta os títulos também se mantiveram estáveis até o T120. (**Tabela 2; Gráfico 2**).

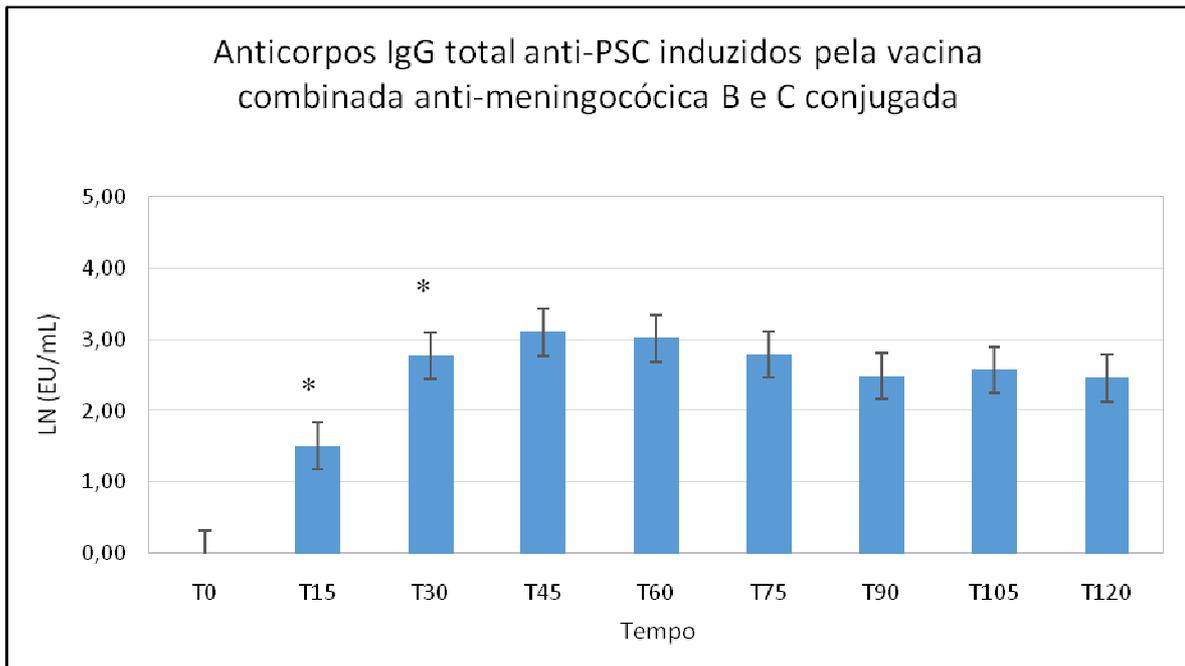
Tabela 2 Concentração de anticorpos (IgG total) anti-VMEs em camundongos imunizados com a vacina meningocócica combinada C conjugada e B

TEMPO	VME N44/89 (LNEU/mL)	VME N603/95 (LN EU/mL)
T0	0	0
T15	2,07 ± 0,2	2,40 ± 0,2
T30	3,41 ± 0,2	3,59 ± 0,8
T45	3,92 ± 0,9 *	4,06 ± 0,4 *
T60	3,59 ± 0,7	4,02 ± 0,8
T75	3,56 ± 0,3	3,96 ± 0,4
T90	3,60 ± 0,2 *	3,61 ± 0,2 *
T105	3,52 ± 0,2	3,60 ± 0,5
T120	3,40 ± 0,1	3,49 ± 0,2

T0 – antes da imunização; T15 – antes da 2ª dose; T30 – antes da 3ª dose; T45 – 15 d após 3ª dose; T60 – 30 d após 3ª dose; T75 a T120 de 15 em 15 dias após 30 dias da 3ª dose. * Teste Kruskal-Wallis $p < 0,05$

Os picos de resposta para as VMEs das duas cepas foram observados no período de 15 dias após a 3ª dose. Os resultados mostram queda significativa dos valores 60 dias após a última dose e estabilidade dos títulos até o final do período de observação.

A resposta para o PSC também se mostrou dose dependente com aumento significativo dos títulos após a 3ª dose. A resposta máxima para este componente foi constatada 30 dias após a 3ª dose, quando os títulos sofreram uma ligeira queda, mas se estabilizaram até T120.



Tempo: T0 – antes da imunização; T15 – antes da 2ª dose; T30 – antes da 3ª dose; T45 – 15 d após 3ª dose; T60 – 30 d após 3ª dose; T75 a T120 de 15 em 15 dias após 30 dias da 3ª dose. * Teste Kruskal-Wallis $p < 0,05$

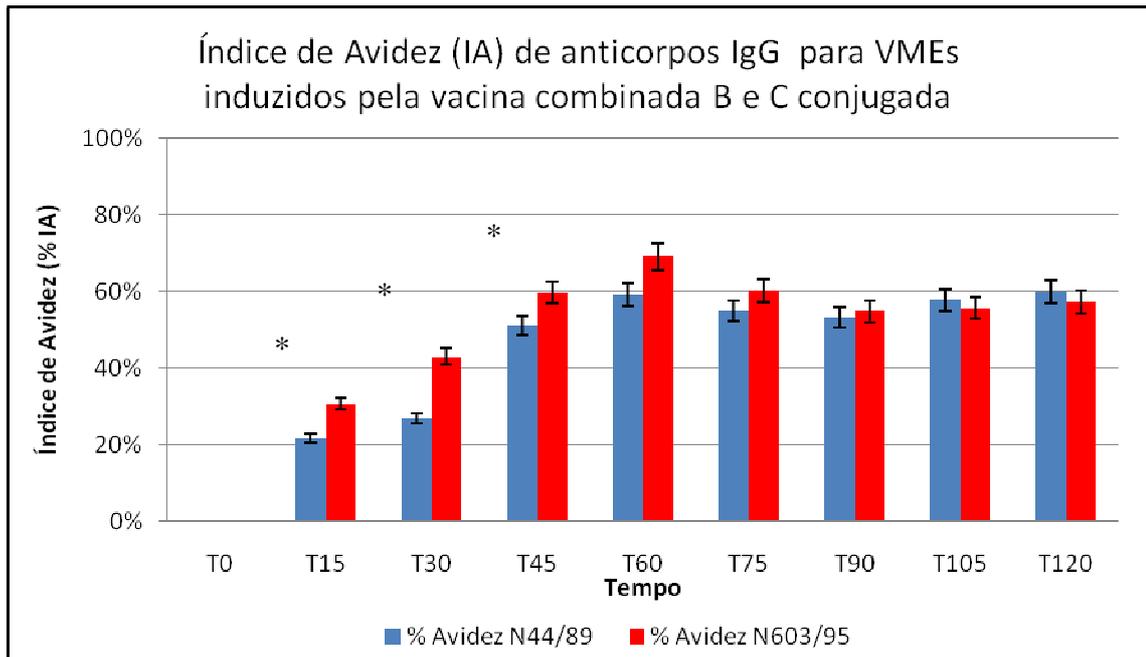
Gráfico 2 Anticorpos IgG total anti-PSC induzidos pela vacina combinada meningocócica B e C conjugada

5.1.2 Índice de Aidez

As amostras de soros pré-ímmunes de animais imunizados com a vacina combinada encontravam-se abaixo do limite de detecção (absorbância de 0,8 a 1,0). Desta forma, os índices de aidez (IAs) não puderam ser calculados porque não alcançariam o mínimo de 50% de redução da absorbância.

Os soros dos camundongos imunizados com a vacina combinada foram submetidos à análise do índice de aidez de anticorpos IgG anti-VMEs de N44/89 e N603/95 e anti-PSC, durante a cinética.

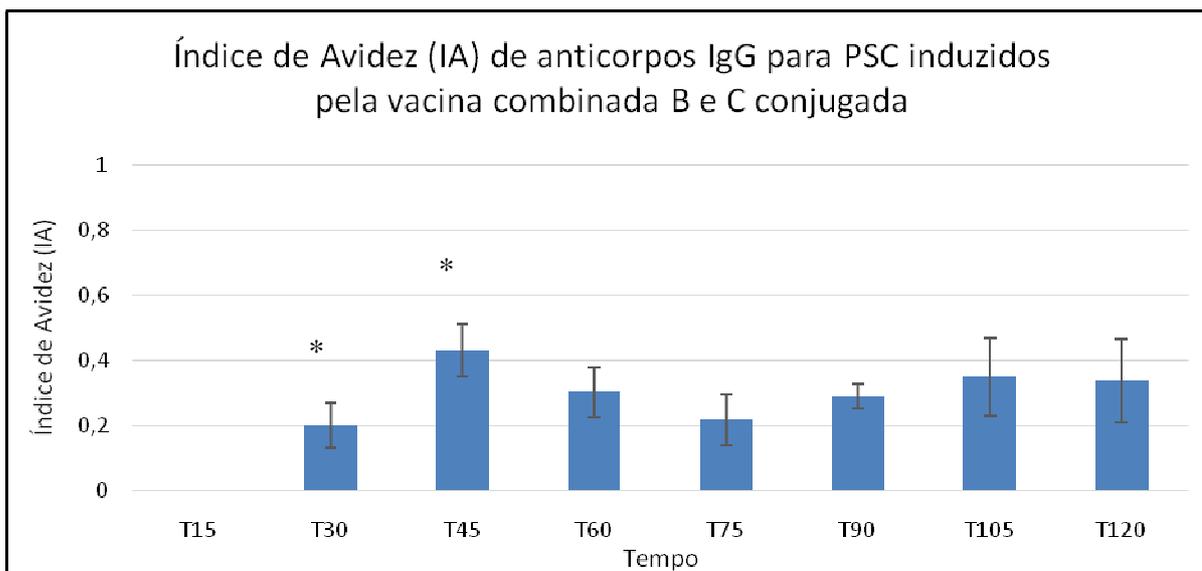
Foi verificado que a aidez dos anticorpos induzidos tanto para VMEs de N44/89 como para N603/95, aumentaram após o esquema vacinal, atingindo o nível máximo de 60% 30 dias após a terceira dose, de maneira semelhante a observada para os títulos de IgG total. Para os dois antígenos protéicos 15 dias após a 3ª dose, a aidez dos anticorpos se manteve inalterada até o T120. (**Gráfico 3**).



Tempo: T0 – antes da imunização; T15 – antes da 2ª dose; T30 – antes da 3ª dose; T45 – 15 d após 3ª dose; T60 – 30 d após 3ª dose; T75 a T120 de 15 em 15 dias após 30 dias da 3ª dose.* Teste Kruskal-Wallis $p < 0,05$

Gráfico 3 Índice de avidez de anticorpos IgG para VMEs das duas cepas vacinais induzidos pela vacina combinada meningocócica B e C conjugada em camundongos

O índice de avidez dos anticorpos IgG para o PSC (**Gráfico 4**) também aumentou significativamente ao longo da imunização, atingindo resposta máxima 15 dias após a última dose da imunização primária. Foi detectada uma variação nos valores do IA, após o pico máximo, mas os valores demonstraram estabilidade até o T120. A queda observada no T75 pode ser variação do método, uma vez que a análise estatística apontou para equivalência dos valores 30 dias após a 3ª dose.



Tempo: T0 – antes da imunização; T15 – antes da 2ª dose; T30 – antes da 3ª dose; T45 – 15 d após 3ª dose; T60 – 30 d após 3ª dose; T75 a T120 de 15 em 15 dias após 30 dias da 3ª dose. * Teste Kruskal-Wallis $p < 0,05$

Gráfico 4 Índice de avidéz de anticorpos IgG para PSC induzidos pela vacina combinada meningocócica B e C conjugada em camundongos.

5.1.3 Atividade bactericida dos anticorpos induzidos frente a cepas vacinais e heterólogas

Da mesma forma que para avaliação de IgG total e índice de avidéz, as amostras do soro de camundongos imunizados com três doses da vacina combinada, em intervalo de 15 dias, foram analisadas com relação a atividade bactericida dos anticorpos para cepas B vacinais, B heterólogas e duas cepas do sorogrupo C. Para a vacina combinada, no estudo de cinética, observou-se que a atividade bactericida dos anticorpos induzidos apresenta uma tendência para resposta dose dependente, porém o aumento parece ser menor para a cepa vacinal N603/95 e cepa B heteróloga 2625.

Os títulos de anticorpos bactericidas para cepas do sorogrupo B, em relação as cepas vacinais, foram maiores para a cepa N44/89 do que para a cepa N603/95. Para o sorogrupo C, os títulos foram mais elevados para a cepa C11 do que para as heterólogas (**Tabela 3**).

Os resultados de atividade bactericida de anticorpos obtidos para as cepas do sorogrupo B, N603/95, 2625 e cepa do sorogrupo C, 2631, sugerem a importância de uma dose reforço a ser administrada com 30 dias após a 3ª dose do esquema de imunização primária, assim como o sugerido pelos resultados de IgG total e avidéz dos anticorpos induzidos.

Tabela 3 Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados, com vacina combinada B com C conjugada por via intramuscular, com 3 doses (T0, T15, T30)

TEMPO	CEPA				
	N44/89 (sorogrupo B vacinal)	N603/95 (sorogrupo B vacinal)	2625 (sorogrupo B heteróloga)	2631 (sorogrupo C heteróloga)	C11 (sorogrupo C heteróloga)
T0	0	0	0	0	0
T15	8 (4-16)	4 (2-4)	8 (4-16)	0	0
T30	512 (256-1024)	128 (64-256)	32 (16-64)	128 (64-256)	1024 (512-1024)
T45	512 (512-1024)	128 (64-256)	32 (16-64)	512 (256-512)	2048 (1024-4096)
T60	1024 (1024-2048)	64 (16-256)	64 (8-128)	256 (256-512)	2048 (1024-2048)
T75	1024 (256-2048)	8 (4-16)	64 (32-128)	256 (128-512)	1024 (512-1024)
T90	1024 (512-1024)	64 (32-256)	8 (4-16)	256 (128-512)	2048 (1024-4096)
T105	1024 (512-1024)	32 (4-128)	32 (16-128)	128 (128-256)	4096 (2048-8192)
T120	512 (512-1024)	64 (16-512)	64 (32-256)	64 (64-128)	2048 (256-8192)

T0 – antes da imunização; T15 – antes da 2ª dose; T30 – antes da 3ª dose; T45 – 15 d após 3ª dose; T60 – 30 d após 3ª dose; T75 a T120 de 15 em 15 dias após 30 dias da 3ª dose.

5.2 Avaliação da resposta humoral induzida pelas vacinas monovalentes e bivalentes com 3 doses de primo vacinação e uma dose reforço

Uma vez definido o momento da dose reforço, vacinas monovalentes e combinações das vacinas meningocócicas B e C conjugadas foram administradas em camundongos. Este procedimento teve como finalidade a quantificação de IgG total induzida para os antígenos vacinais (VMEs e PSC), índice de avidéz, isotipos de IgG e atividade bactericida destes anticorpos após o esquema de 3 doses e uma dose reforço 30 dias após a 3^a dose.

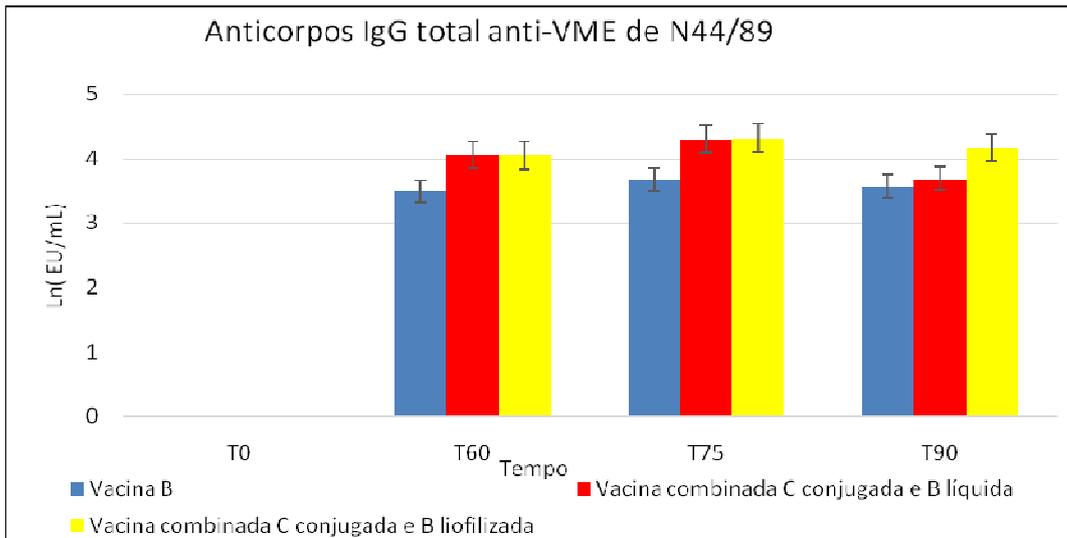
Após o esquema completo de imunização, esses animais foram desafiados com as cepas vacinais do sorogrupo B, N44/89, N603/95, cepa B heteróloga 2625, e a cepa C 2135.

As amostras analisadas foram do soro pré-imune (T0), com 3 doses de imunização primária antes do reforço (T60), 15 dias após a dose reforço (T75) e 30 dias após a dose reforço (T90).

5.2.1 Quantificação de anticorpos IgG total para VMEs e PSC pelo método de ELISA

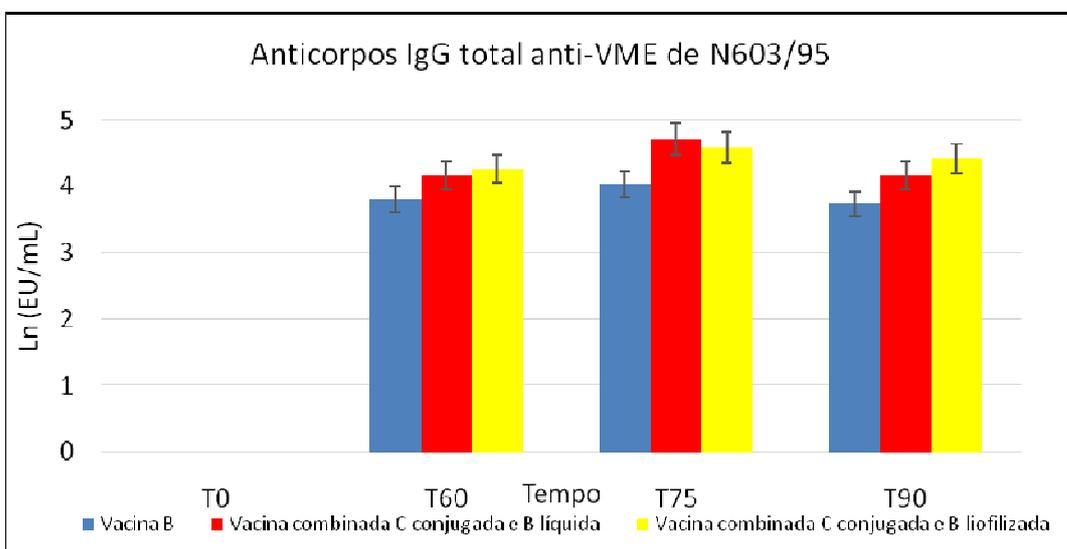
Os títulos de IgG total para VMEs de N44/89 e N603/95, obtidos antes da dose reforço, foram equivalentes para a vacina meningocócica B monovalente e combinações com a vacina C conjugada líquida ou liofilizada. De uma forma geral, após a dose reforço, a avaliação estatística realizada, demonstrou que para as duas VMEs das cepas B vacinais, os títulos de IgG total foram significativamente maiores na combinação das vacinas meningocócica B e C conjugada desde 15 dias após a dose reforço.

Para as combinações de vacina meningocócica B com C conjugada verificou-se que a combinação, no momento da injeção, da C conjugada liofilizada com a vacina meningocócica B, induziu títulos de IgG total para as duas VMEs maiores do que a combinação com o conjugado na forma líquida. Os resultados sugerem que para os antígenos da vacina meningocócica B a combinação liofilizada da C conjugada é mais adequada (**Gráficos 5 e 6**).



Tempo: T0 (pré-imune); T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$. *

Gráfico 5 IgG total para VME da cepa N44/89 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a vacina C conjugada líquida e combinada a vacina C conjugada liofilizada.



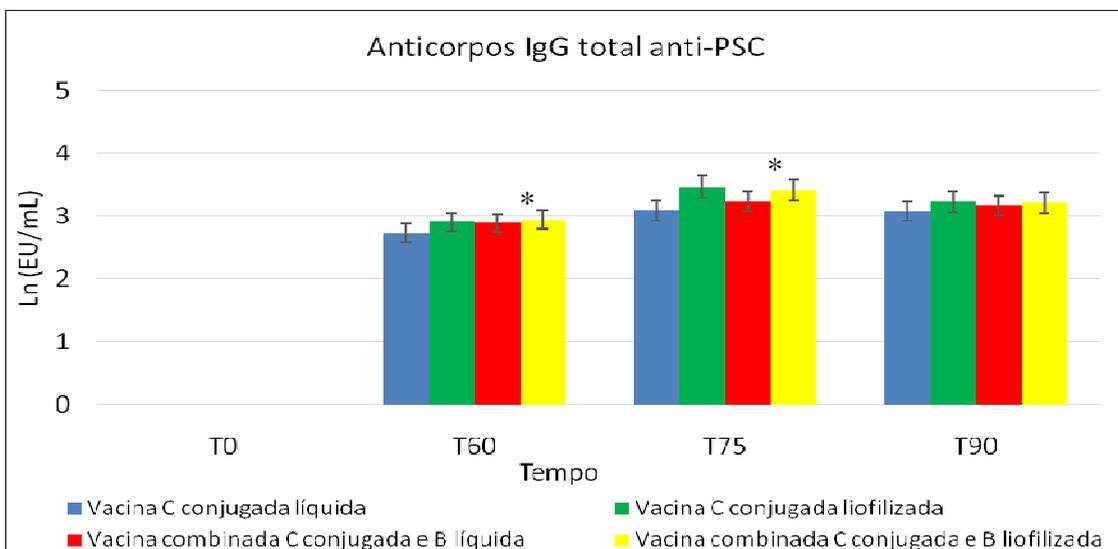
Tempo: T0 (pré-imune); T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 6 IgG total para VME da cepa N603/95 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a vacina C conjugada líquida e combinada a vacina C conjugada liofilizada.

Para análise do PSC, foi realizado um estudo comparativo entre as vacinas C conjugada monovalente líquida e liofilizada com as combinações correspondentes a vacina meningocócica B.

Antes da dose reforço as concentrações de IgG total para o PSC induzidas pelas preparações teste monovalentes ou combinadas foram equivalentes. Após 15 dias da dose reforço, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) dos títulos de IgG tanto para as vacinas monovalentes quanto para as combinadas.

No tempo de observação de 30 dias após a dose reforço, a vacina monovalente liofilizada induziu títulos de IgG total para PSC, significativamente mais elevados que os induzidos pela vacina monovalente formulada líquida. Quando da análise as combinações da meningocócica B com C conjugada liofilizada e líquida, foi observado que os títulos induzidos pela preparação liofilizada foram mais elevados até 15 dias após o reforço e equivalentes 30 dias após reforço. Da mesma forma que para os antígenos da vacina B, a combinação da forma liofilizada da vacina C conjugada com a vacina meningocócica B apresenta uma tendência, em IgG total mais favorável para o PSC (**Gráfico 7**).



Tempo: T0 (pré-imune); T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 7 Quantificação dos níveis de IgG total anti-PSC em soros de camundongos imunizados com as vacinas C conjugadas líquida e liofilizada monovalentes e combinadas a vacina meningocócica B.

5.2.2 Determinação dos isotipos de IgG

Em primeira análise de indução de diferentes isotipos em amostras de soro de animais que receberam diferentes vacinas, empregando-se IgG total como *coating* das placas para avaliação de concentração proporcional de isotipos produzidos. Para o isotipo IgG1 na análise do T60, as vacinas combinadas, tanto na forma líquida quanto na liofilizada, apresentaram maior concentração desse isotipo. Após a dose reforço todas apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$); porém a vacina combinada na forma líquida com maior expressão. Trinta dias após o reforço a vacina combinada liofilizada e a monovalente C líquida, foram as que apresentaram maior concentração (**Tabela 4**).

Para o isotipo IgG2a no T60 a combinação na forma líquida foi a que apresentou maior concentração. Após a dose reforço todas as vacinas apresentaram aumento de concentração, sendo a vacina combinada na forma líquida a que mais induziu esse isotipo. Trinta dias após o reforço as vacinas monovalentes C líquida e B voltaram a concentração equivalente antes da dose reforço; e as vacinas combinadas e monovalente C liofilizada permaneceram com níveis de IgG2a aumentados, a vacina combinada líquida com maior concentração (**Tabela 4**).

Para o isotipo IgG2b no T60 a vacina monovalente C liofilizada foi a que apresentou maior concentração desse isotipo. Após a dose reforço nenhuma vacina expressou aumento significativo desse isotipo. Trinta dias após a dose reforço a concentração desse isotipo apresentou um declínio, chegando a concentrações mais baixas que antes da dose reforço, exceto para as vacinas combinadas, onde a combinada líquida apresentou concentração maior que a da vacina combinada liofilizada (**Tabela 4**).

Para o isotipo IgG3 no T60 a vacina combinada líquida foi a que apresentou maior concentração. Após a dose reforço a maioria dos grupos apresentaram um aumento da concentração desse isotipo, porém pouco expressivo e a combinada líquida com uma tendência maior, porém sem significância estatística. Trinta dias após a dose reforço, as duas vacinas combinadas apresentaram concentrações semelhantes, porém ao analisar a concentração antes da dose reforço, a vacina combinada liofilizada apresentou maior conversão (**Tabela 4**).

Tabela 4 Quantificação de isotipos de IgG total em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócicas

VACINA	ISOTIPO	TEMPO (DIAS)		
		60	75	90
VACINA MENINGOCÓCICA B	IgG1 (µg/mL)	5955,65	15783,29	9594,91
	IgG2a (µg/mL)	9651,23	11487,16	9751,26
	IgG2b (µg/mL)	8842,24	7194,48	6885,21
	IgG3 (µg/mL)	641,67	417,29	494,65
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA LÍQUIDA	IgG1 (µg/mL)	9785,52	14801,79	17382,70
	IgG2a (µg/mL)	9245,06	8812,86	9194,84
	IgG2b (µg/mL)	5118,48	4898,06	4040,31
	IgG3 (µg/mL)	423,87	456,58	559,58
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA LIOFILIZADA	IgG1 (µg/mL)	6012,68	9153,48	8010,23
	IgG2a (µg/mL)	6069,92	10309,77	8282,27
	IgG2b (µg/mL)	19657,80	15860,50	10011,55
	IgG3 (µg/mL)	564,76	917,65	1055,83
VACINA COMBINADA: MENINGOCÓCICA C CONJUGADA E B LÍQUIDA	IgG1 (µg/mL)	11940,37	44646,11	12680,65
	IgG2a (µg/mL)	12387,58	19935,18	16909,93
	IgG2b (µg/mL)	8921,80	10882,75	12732,72
	IgG3 (µg/mL)	816,84	1983,55	1205,44
VACINA COMBINADA: MENINGOCÓCICA C CONJUGADA LIOFILIZADA E B LÍQUIDA	IgG1 (µg/mL)	12102,28	21909,44	19229,00
	IgG2a (µg/mL)	9743,39	11027,81	12840,18
	IgG2b (µg/mL)	8491,71	7772,47	9389,12
	IgG3 (µg/mL)	596,82	1306,59	1228,65

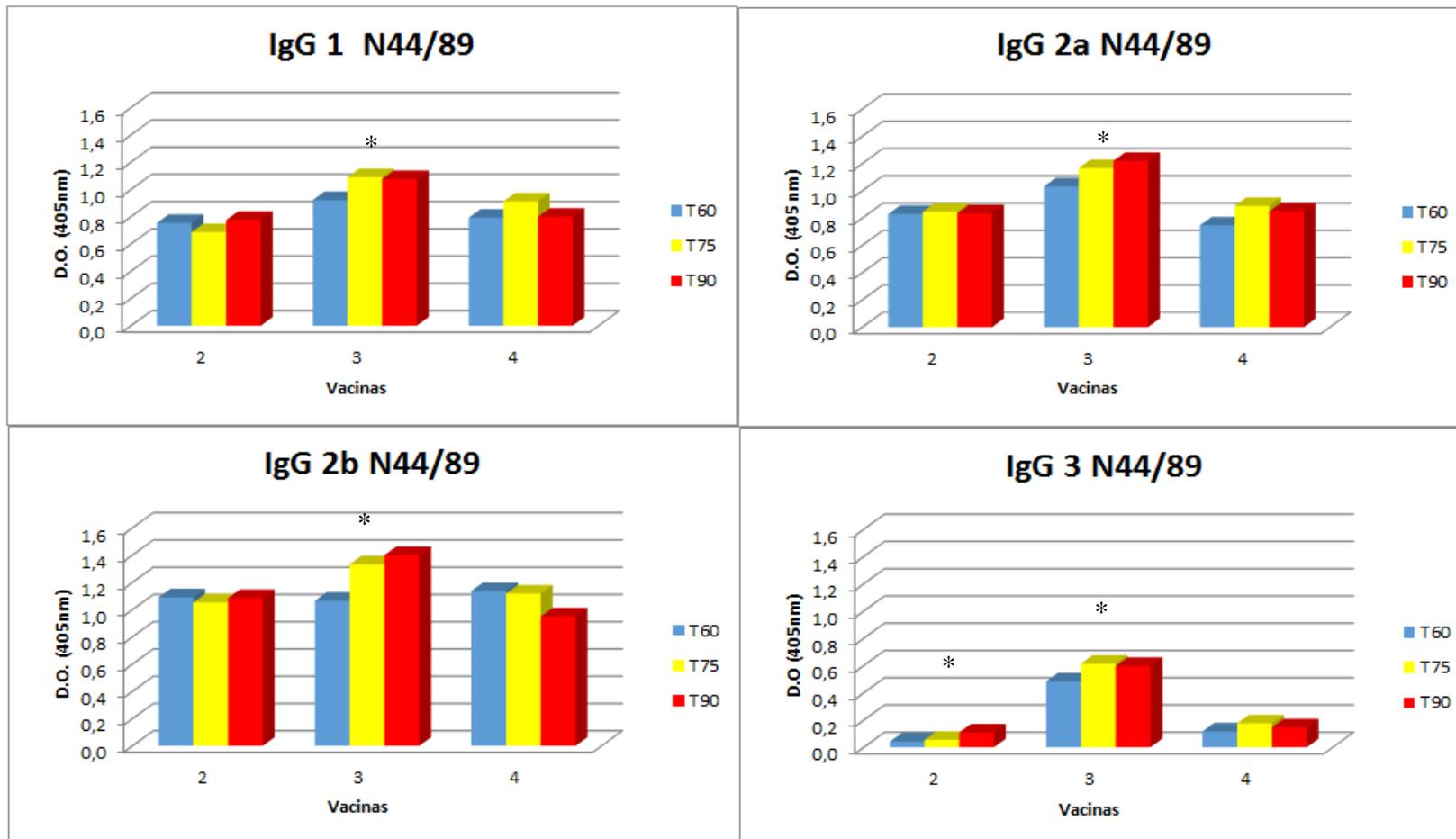
Observamos que todas as vacinas induziram aumento da diferenciação dos isotipos após imunização primária, com privilégio para os isotipos IgG1 e IgG2a. Após a dose reforço observamos aumento significativo destes dois anticorpos para as vacinas monovalentes e bivalentes com maior expressão nas vacinas combinadas, principalmente a combinada líquida. Por outro lado, não houve aumento significativo de IgG2b para nenhuma preparação teste, monovalente ou bivalente. Com relação a IgG3 observamos aumento ao longo do esquema de imunização para as vacinas monovalentes e bivalentes, porém sem aumento significativo após a dose reforço.

Quando comparamos a concentração dos isotipos induzidos pelas vacinas combinadas com as monovalentes correspondentes, podemos observar que a combinação proporcionou um aumento de em torno de 2 x mais anticorpo.

Uma vez analisadas as variações de concentrações dos diferentes isotipos ao longo do esquema vacinal adotado, foi realizada uma segunda análise de isotipos de IgG, frente a cada antígeno vacinal, VMEs N44/89, N603/95 e PSC.

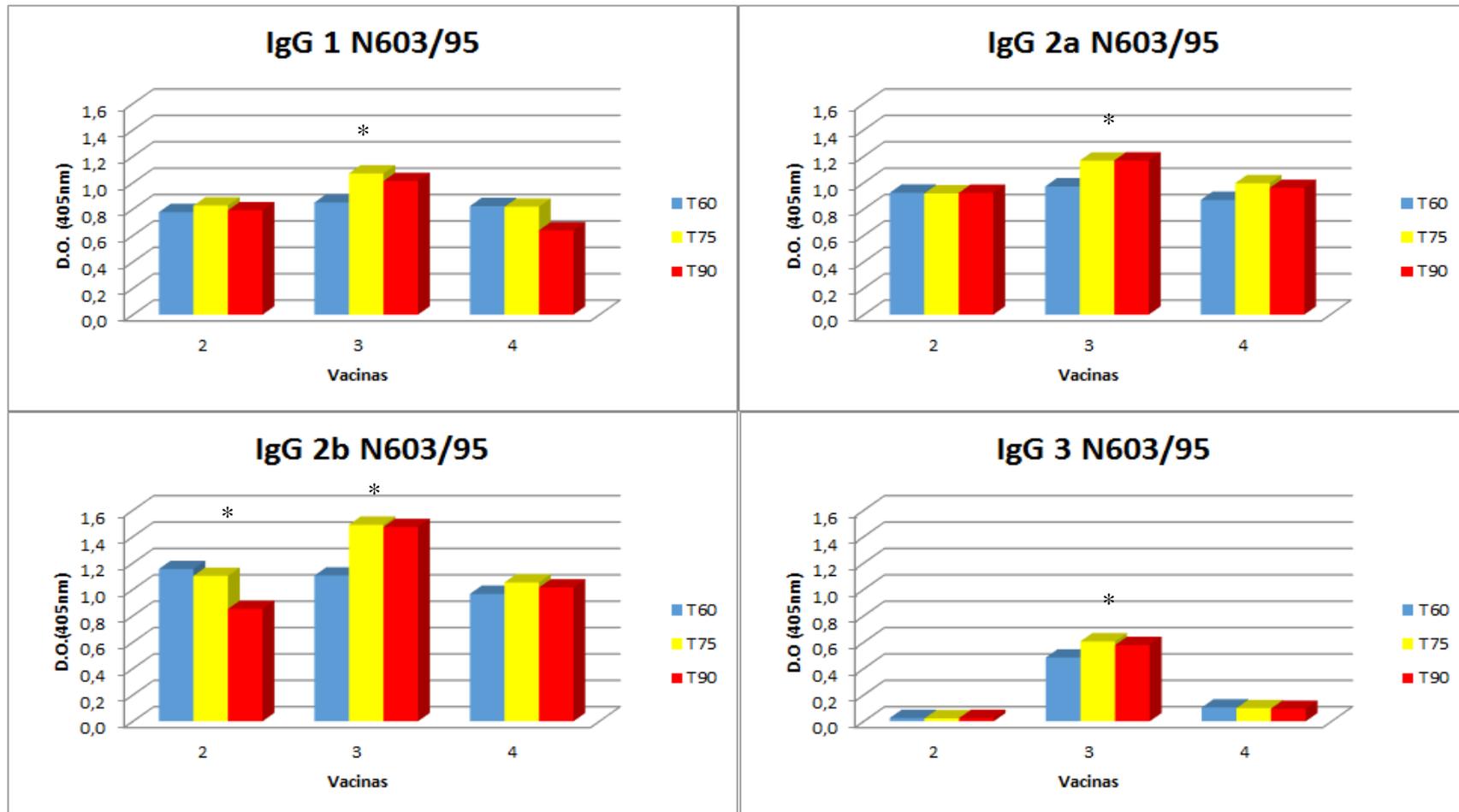
Os isotipos de IgG produzidos contra as VMEs apresentaram níveis semelhante de produção entre as duas vesículas (N44/89 e N603/95), não houve diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

Ao analisarmos comparativamente as vacinas podemos identificar que a combinação entre elas, tanto na forma líquida quanto na liofilizada, foi positiva para as VMEs, onde para todos os isotipos analisados observamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à vacina monovalente, assim como observado na quantificação de IgG total para as VMEs. Quanto à análise do efeito da dose reforço nos camundongos, foi observado que a quarta dose administrada também contribuiu significativamente para o desenvolvimento da resposta apresentada, porém os níveis desses anticorpos já estavam em níveis elevados após o esquema vacinal primário (**Gráficos 8 e 9**).



Tempo: T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Vacina 2: Vacina meningocócica B, vacina 3: Vacina combinada C conjugada e B líquida, vacina 4: Vacina combinada C conjugada e B liofilizada. Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 8 Concentração dos isotipos de IgG contra VME N44/89



Tempo: T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Vacina 2: Vacina meningocócica B, vacina 3: Vacina combinada C conjugada e B líquida, vacina 4: Vacina combinada C conjugada e B liofilizada. Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 9 Concentração dos isotipos de IgG contra VME N603/95

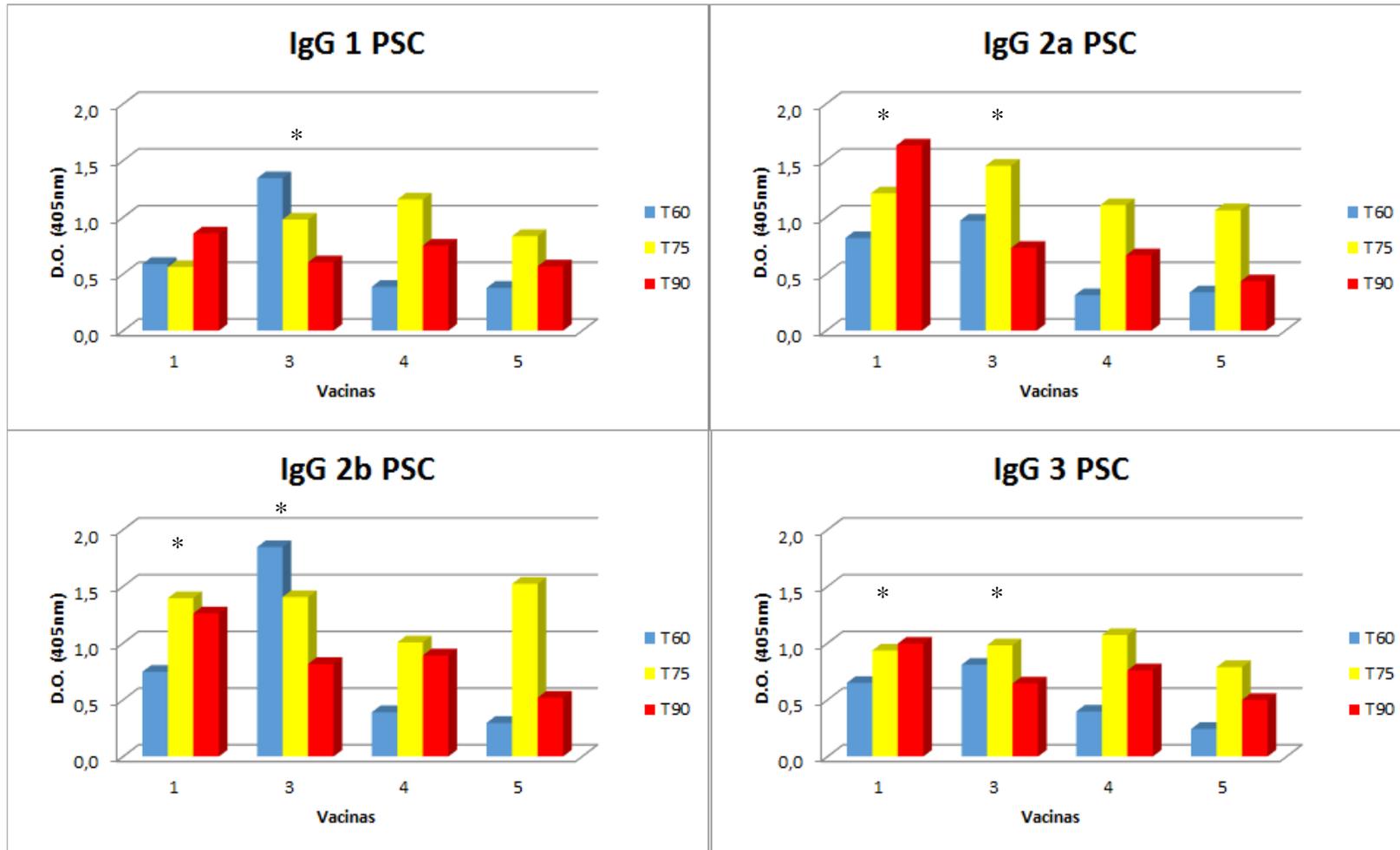
Assim como os testes anteriores, os soros dos camundongos imunizados com as vacinas monovalentes C conjugadas e vacinas combinadas C e B, tanto líquida quanto liofilizada, foram analisados frente aos isotipos de IgG contra o PSC.

As vacinas foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) no desenvolvimento dos isotipos. Para IgG1, antes da dose reforço as vacinas apresentaram semelhança entre elas ($p > 0,05$), exceto para a vacina bivalente na forma líquida, onde os níveis desse isotipo produzidos foram superiores as outras vacinas. A administração da dose reforço favoreceu o aumento da concentração desses anticorpos para as vacinas monovalente e bivalente liofilizada, porém 30 dias após a 4ª dose foram iguais (**Gráfico 10**).

Para o isotipo IgG2a após o esquema vacinal podemos observar que as vacinas na forma líquida apresentaram maior concentração desse isotipo. A dose reforço aumentou significativamente a concentração deste anticorpo e 30 dias após essa dose o declínio foi menos expressivo para a vacina monovalente líquida (**Gráfico 10**).

Para o isotipo IgG2b após o esquema vacinal primário a vacina bivalente na forma líquida apresentou maior concentração desse isotipo. Após a dose reforço todas as vacinas provocaram um aumento significativo desse isotipo, exceto para a vacina bivalente líquida e 30 dias após a dose reforço, a concentração desses anticorpos entre as vacinas combinadas foram semelhantes (**Gráfico 10**).

Para o isotipo IgG3 as vacinas na forma líquida apresentaram maior concentração após o esquema vacinal. Após a dose reforço a concentração isotipos foram igualados e 30 dias após a dose reforço a vacina monovalente líquida não apresentou declínio desse isotipo (**Gráfico 10**).



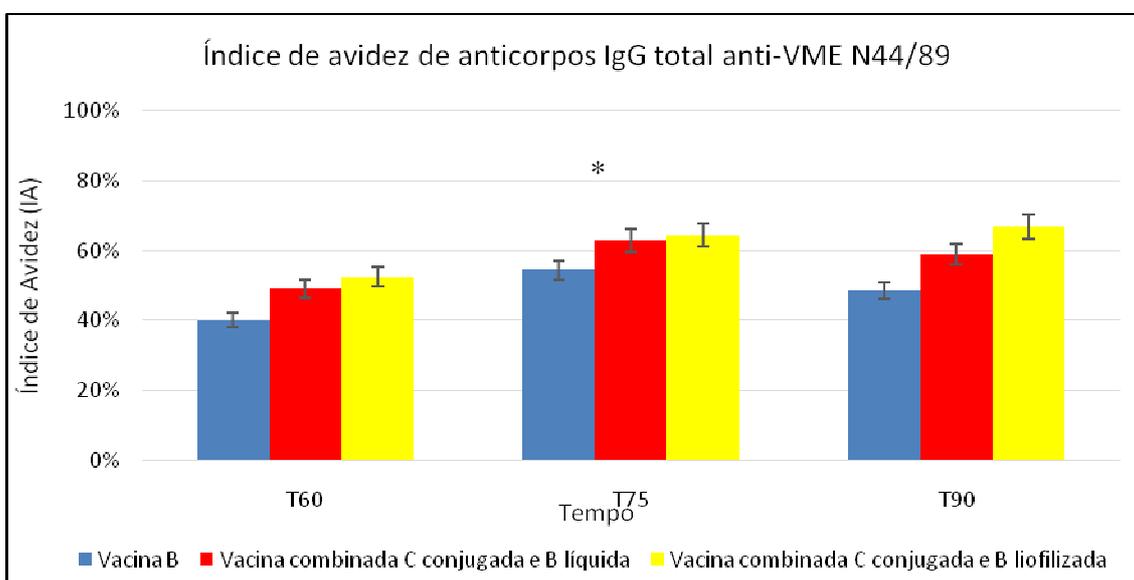
Tempo: T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Vacina 1: Vacina C conjugada líquida, vacina 3: Vacina combinada C conjugada e B líquida, vacina 4: Vacina combinada C conjugada e B liofilizada e vacina 5: Vacina C conjugada liofilizada. Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 10 Concentração dos isotipos de IgG contra PSC

Quando se avalia a resposta induzida pelas vacinas frente aos diferentes antígenos vacinais verificamos que a combinação das duas vacinas induziu especificidade crescente para os componentes vacinais, com especial efeito na resposta contra o PSC.

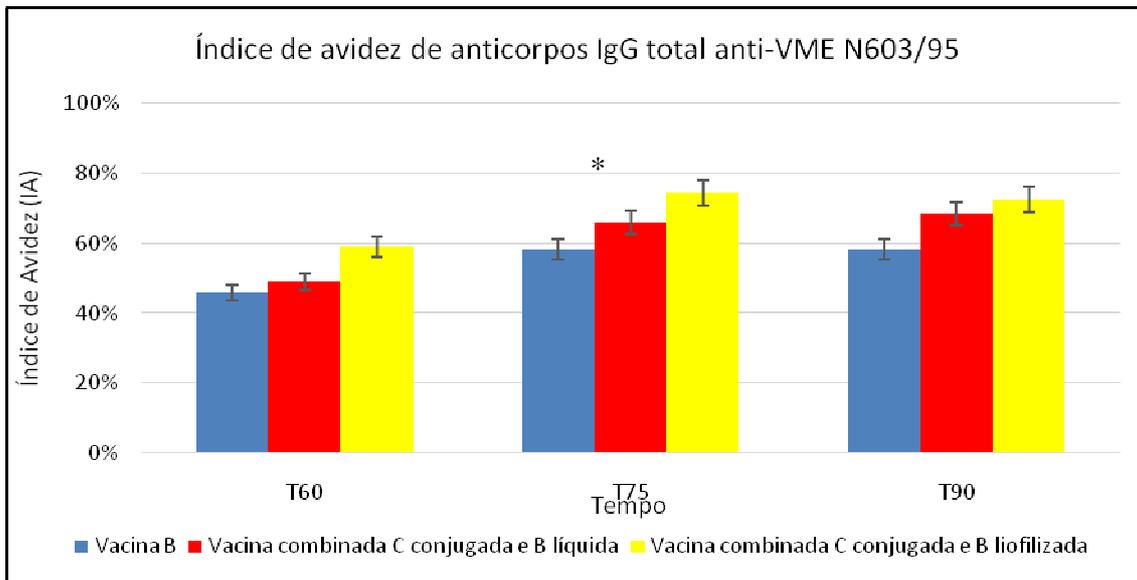
5.2.3 Índice de avidéz

Antes da dose reforço, as vacinas combinadas, sem diferença entre elas, já induziram IA maior para as duas VMEs do que a meningocócica B monovalente. Após a dose reforço, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) do índice de avidéz para as duas VMEs, tanto para a vacina monovalente meningocócica B como combinadas. No entanto, observou-se que o índice de avidéz dos anticorpos induzidos pelas vacinas combinadas foram estatisticamente maiores do que os obtidos na vacina monovalente. Não foi observada diferença entre as combinações líquida e liofilizada. (**Gráficos 11 e 12**)



Tempo: T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 11 Índice de avidéz de IgG para VMEs da cepa N44/89 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a C Conjugada Líquida e C conjugada liofilizada.



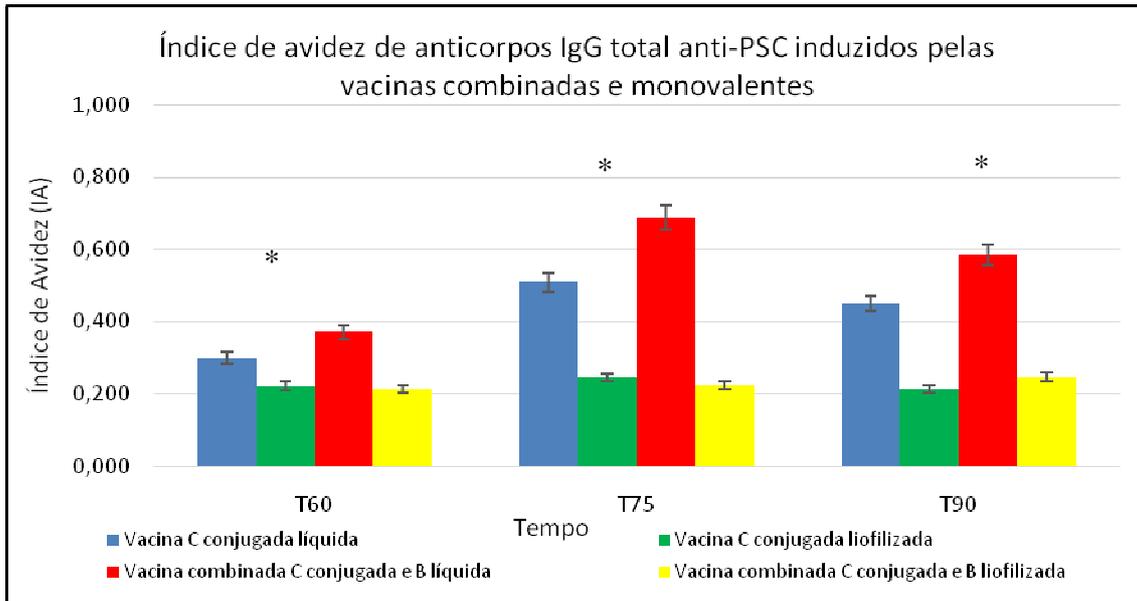
Tempo: T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 12 Índice de avidéz de IgG para VMEs da cepa N603/95 em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica B monovalente, combinada a C Conjugada líquida e C conjugada liofilizada

Da mesma forma que para a avaliação da concentração de IgG total para PSC, na avaliação do índice de avidéz empregou-se no estudo comparativo as vacinas C conjugada monovalente líquida e liofilizada com as correspondentes combinadas a vacina meningocócica B.

As vacinas, monovalente e combinada, na forma líquida apresentaram maior índice de avidéz para o PSC após o esquema vacinal primário, diferente estatisticamente das vacinas na forma liofilizada.

Após a administração da dose reforço os camundongos imunizados com as vacinas na forma líquida apresentaram aumento do IA, sendo que a vacina combinada apresentou maior índice. Quando analisados 30 dias após essa dose reforço o IA dos camundongos imunizados com as vacinas líquidas apresentaram menor declínio que as vacinas na forma liofilizada (**Gráfico 13**).



T60 (antes da dose reforço); T75 (15 dias após a dose reforço); T90 (30 dias após a dose reforço). Teste W de Man-Whitney, $p < 0,05$.

Gráfico 13 Índice de avidéz de IgG para PSC em soros de camundongos imunizados com as vacinas meningocócica C conjugada líquida e liofilizada monovalentes, e combinadas a vacina meningocócica B.

5.2.4 Atividade bactericida dos anticorpos induzidos frente a cepas vacinais e heterólogas

As tabelas 5 e 6 mostram os resultados de atividade bactericida dos anticorpos induzidos pelas preparações teste frente a cepas B vacinais, B heteróloga e duas cepas do sorogrupo C (C11 e 2631) antes, 15 e 30 dias após a dose reforço.

Antes da dose reforço observamos que para as duas cepas B vacinais, os valores dos títulos bactericida induzidos pela vacina meningocócica B monovalente e combinadas são semelhantes. Vale ressaltar que os títulos são considerados semelhantes, pois estão dentro da faixa de variação prevista para este ensaio (equivalência de valores de $1 \log_2$ para cima ou para baixo). Os títulos para a cepa N44/89 são significativamente maiores ($\geq 2 \log_2$) do que os induzidos para a cepa

N603/95. Para a cepa B heteróloga (2625) os títulos são ainda menores do que os observados para a cepa vacinal N603/95.

Após a dose reforço, não foi observado aumento significativo nos títulos para a cepa B vacinal N44/89 ou para as cepas vacinais N603/95 e B heteróloga.

Para a cepa C11, do sorogrupo C, antes da dose reforço, observa-se semelhança na atividade bactericida induzida pelas vacinas monovalentes e combinadas. Verificou-se um título bactericida mais elevado para a vacina combinada com o componente conjugado líquido. Porém a consistência deste resultado precisa ser avaliada.

Os valores obtidos para esta cepa (C11) após a dose reforço apresentaram tendência de aumento para as vacinas monovalentes e combinadas sendo que para as vacinas combinadas parecem ser mais expressivos.

Para a cepa 2631, observamos, antes da dose reforço, que a vacina monovalente líquida induziu títulos inferiores aos induzidos pela monovalente liofilizada e também os obtidos com as 2 vacinas combinadas. Após a dose reforço, a vacina monovalente líquida induziu aumento pouco significativo na atividade bactericida com valores também inferiores aos induzidos pela monovalente liofilizada e as duas preparações combinadas. As vacinas monovalentes liofilizadas e combinada meningocócica B e C conjugadas induziram títulos semelhantes após a dose reforço. Para estas 3 vacinas, para as cepas do sorogrupo C testadas, foi observado aumento significativo ($\geq 2 \log_2$) dos títulos, após a dose reforço e manutenção destes valores 30 dias após sua administração.

Tabela 5 Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados, por via intramuscular, com as vacinas meningocócica B e monovalentes C conjugadas líquida e liofilizada

VACINA	CEPA	TEMPO (DIAS)			
		0	60	75	90
VACINA MENINGOCÓCICA B	N44/89	0	1024 (256-1024)	1024 (512-2048)	1024 (512-2048)
	N603/95	0	64 (16-128)	128 (64-512)	128 (64-256)
	2625	0	32 (8-64)	128 (8-56)	128 (8-256)
	2631	0	0	0	0
	C11	0	0	0	0
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA LÍQUIDA	N44/89	0	-	-	-
	N603/95	0	-	-	-
	2625	0	-	-	-
	2631	0	256 (18-512)	512 (512-1024)	512 (512)
	C11	0	1024 (1024-2048)	4096 (2048-8192)	2048 (1024-4096)
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA LIOFILIZADA	N44/89	0	-	-	-
	N603/95	0	-	-	-
	2625	0	-	-	-
	2631	0	1024 (512-2048)	8192 (4096-8192)	4096 (1024-8192)
	C11	0	1024 (1024-2048)	8192 (8192)	4096 (2048-8192)

Tempo: T0 (pré-imune), T60 (antes da dose reforço), T75 (15 dias após a dose reforço) e T90 (30 dias após a dose reforço)

Tabela 6 Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados, por via intramuscular, com as vacinas combinadas meningocócicas B e C conjugadas líquida e liofilizada

VACINA	CEPA	TEMPO (DIAS)			
		0	60	75	90
VACINA COMBINADA: MENINGOCÓCICA C CONJUGADA E BLÍQUIDA	N44/89	0	2048 (512-2048)	2048 (1024-2048)	2048 (1024-4096)
	N603/95	0	128 (64-256)	512 (256-1024)	256 (128-512)
	2625	0	32 (16-64)	128 (32-512)	256 (64-512)
	2631	0	1024 (512-1024)	4096 (1024-4096)	1024 (512-1024)
	C11	0	4096 (1024-4096)	4096 (1024-8192)	4096 (1024-4096)
VACINA COMBINADA: MENINGOCÓCICA C CONJUGADA LIOFILIZADA E B LÍQUIDA	N44/89	0	2048 (512-2048)	2048 (1024-4096)	1024 (1024-2048)
	N603/95	0	128 (64-128)	256 (128-512)	512 (256-1024)
	2625	0	32 (16-64)	64 (16-256)	64 (16-256)
	2631	0	2048 (1024-2048)	8192 (4096-8192)	4096 (2048-4096)
	C11	0	1024 (1024-2048)	8192 (8192)	8192 (4096-8192)

Tempo: T0 (pré-imune), T60 (antes da dose reforço), T75 (15 dias após a dose reforço) e T90 (30 dias após a dose reforço).

5.3 Ensaio Desafio

Para avaliação da proteção conferida pelas vacinas experimentais foi utilizado o teste de desafio, empregando-se como alvo as cepas de *N. meningitidis* sorogrupo B vacinais (N44/89 e N603/95), uma heteróloga, 2625 e uma cepa de *N. meningitidis* sorogrupo C, 2135. Foram desafiados grupos que receberam as vacinas monovalente meningocócica B, monovalentes conjugadas líquida e liofilizada e combinadas. Foi utilizado um grupo que recebeu PBS como controle do teste. A **Tabela 7** apresenta os resultados em animais que sobreviveram ao desafio após 72 horas de acompanhamento.

Tabela 7 Proteção de camundongos vacinados com 3 doses de vacinas teste em imunização primária e uma dose reforço, e desafiados com diferentes suspensões bacterianas. Para todas as cepas desafio utilizou-se 1 DL50 e os animais foram observados por 72 horas

Cepa desafio	Sobrevida (% em desafio com 25 camundongos)		
	Vacina C conjugada monovalente	Vacina meningocócica B monovalente	Vacina C conjugada + Vacina meningocócica B
N44/89 (B Vacinal)	ND	72%	96%
N603/95 (B vacinal)	ND	28%	16%
2625 (B heteróloga)	ND	60%	64%
2135 (C produção PSC)	96%	ND	100%

ND – Não determinado

Os resultados indicam que a proteção para as cepas B vacinais e heteróloga foi equivalente na vacina meningocócica B monovalente e na combinação com a vacina C conjugada. Observou-se também equivalência na proteção para a cepa desafio do sorogrupo C (2135) na vacina C conjugada monovalente e combinada à meningocócica B. Os desafios com a cepa do sorogrupo C foram realizados apenas com as formulações líquidas tanto monovalentes como combinadas. Na comparação realizada pelo teste desafio, os resultados sugerem que a combinação das duas preparações experimentais não teve impacto sobre a proteção induzida no modelo animal empregado.

6 DISCUSSÃO

Desde o final do século XX, a vacinação de rotina contra a doença meningocócica tornou-se cada vez mais generalizada, devido aos avanços contínuos em tecnologia e aumento da conscientização sobre a doença. Mesmo com todo o desenvolvimento científico no campo das imunizações, a doença meningocócica permanece como um sério problema de saúde pública, sendo relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças e lactentes em várias regiões do mundo. O principal fator de risco para adquirir a doença é a ausência de anticorpos bactericidas (Emonts *et al.*, 2003).

O princípio de usar o polissacarídeo capsular como um antígeno vacinal foi descoberto e desenvolvido por Emil C.Gotschlich, Irvin Goldschneider e seus colegas no Instituto Walter Reed de Pesquisas do Exército, EUA, no final de 1960. Os seus esforços resultaram em boas vacinas contra os sorogrupos A e C. Depois do aparecimento dos sorogrupos Y e W, vacinas foram desenvolvidas usando a mesma estratégia, e uma vacina quadrivalente contendo os polissacarídeos ACYW foilicenciada em 1981 (Holst *et al.*, 2013).

Neste contexto, as vacinas polissacarídicas, disponíveis no Brasil, oferecem proteção contra os sorogrupos A e C. Tais vacinas, assim como ocorre com outras vacinas não conjugadas, não geram resposta imune adequada e duradoura em crianças menores de 2 anos de idade, em função da ausência de resposta consistente a antígenos T independentes nessa faixa etária (Sáfadi *et al.*, 2012).

Inicialmente foram desenvolvidas, no final dos anos 90, vacinas meningocócicas monovalentes conjugadas, contra o meningococo sorogrupo C contendo o polissacarídeo conjugado à toxina mutante difitérica (MCC-CRM197-Wyeth e Novartis) ou ao toxóide tetânico (MCC-TT-Baxter). Essas vacinas se mostraram imunogênicas em lactentes, pré-escolares, crianças maiores, adolescentes e adultos. Posteriormente, foi também licenciada, inicialmente no Reino Unido, uma vacina combinada *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)-MenC conjugada ao toxóide tetânico (GSK). Essas vacinas conjugadas oferecem proteção adequada e duradoura a crianças menores de 2 anos de idade, desencadeando, ainda, uma resposta de memória. Essa efetividade, além de reduzir o número de

casos de DM, também diminui a colonização da bactéria e sua transmissão (Granoff *et al.*, 2008).

O controle do meningococo do sorogrupo B (MenB) é o desafio global para a contenção da DM. O polissacarídeo capsular de MenB foi determinado inadequado para o desenvolvimento de vacinas devido à baixa imunogenicidade e o risco potencial de auto-imunidade. As vacinas baseadas em proteínas de membrana externa (VME), desenvolvidas em Cuba e na Noruega, foram utilizadas com sucesso no controle de surtos; entretanto, a resposta imune a essas vacinas é específica para os sorosubtipos de meningococo B incluídos na vacina, impedindo que a proteção oferecida seja abrangente para outros sorosubtipos do meningococo B (Holst *et al.*, 2013).

A combinação de vacinas é uma estratégia utilizada para que uma única formulação contenha diferentes antígenos que integram ativamente a formulação final. Essas vacinas podem se apresentar em uma formulação combinada ou esta combinação pode ser realizada no momento da imunização. Essas formulações também têm como objetivo reduzir o número de injeções necessárias na rotina de imunizações, bem como diminuir o número de visitas aos locais de vacinação. Uma desvantagem da combinação de vacinas é a possibilidade de ocorrer interferências entre alguns de seus componentes, levando a diminuição da resposta imunológica. (Martins, 2011).

Para vacinas contra o meningococo a tendência de combinação tem se consolidado a partir da inclusão de vacinas monovalentes em diferentes países da Europa e Américas. Nesta rotina além da observação de eficácia na redução drástica de doença causada pelas cepas vacinais também teve início estudos importantes com relação ao impacto da vacinação nos estados de portador e na avaliação da manutenção de títulos protetores ao longo do tempo (Ruttimann *et al.*, 2014).

Vacinas meningocócicas multivalentes têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a cobertura vacinal entre os sorogrupos, possivelmente emergentes neste novo cenário. A combinação clássica que vem sendo adotada para vacinas meningocócicas tem gerado produtos licenciados preferencialmente compostos de conjugados para os sorogrupos A, C, W e Y. Inclusive algumas destas vacinas já fazem parte de programas de imunização nos EUA e Canadá em indivíduos de faixa etária de a partir de 2 meses (Hedari *et al.*, 2014).

A partir dessa abordagem, esse estudo foi proposto para avaliar o efeito da combinação entre as vacinas brasileiras, meningocócica C conjugada e vacina meningocócica B, na resposta humoral induzida para as duas vacinas em camundongos, através da quantidade, qualidade e atividade funcional dos anticorpos induzidos. A combinação proposta foi originada a partir dos resultados obtidos nos ensaios clínicos de fase I e II em seres humanos. A opção do uso de diferentes ensaios teve como objetivo tentar correlacionar resultados e estimular a discussão sobre a resposta imune induzida por estas vacinas.

Na década de 1960, Goldschneider e colaboradores (1969), usando o ensaio de atividade bactericida do soro (SBA) constatou que recrutas militares com títulos $\geq 1:4$, que foram expostos durante uma epidemia meningocócica causada pelo grupo C não desenvolveram a doença, enquanto praticamente todos os casos ocorreram em indivíduos cujos títulos SBA foram $< 1:4$. Além disso, SBA foi raramente detectada em crianças de 2 meses a 2 anos de idade, a faixa etária com maior incidência da doença. Em contraste, muitos adultos, nos quais a doença era rara, tinham títulos SBA $\geq 1:4$ medidas contra os sorogrupos A, B e C. Desde então o desenvolvimento de anticorpos bactericidas tem sido decrito como importante marcador de soroproteção contra a doença.

A partir daí vacinas polissacarídicas e posteriormente conjugadas, para a maioria dos sorogrupos de meningococo, vêm sendo desenvolvidas e sua avaliação de proteção induzida comprovam estes primeiros estudos. Da mesma forma, vacinas protéicas contra o sorogrupo B, compostas de vesículas de membrana externa e mais recentemente adicionadas de proteínas recombinantes, também confirmam a importância da atividade funcional de anticorpos induzidos pelas vacinas na proteção contra a doença (Hedari *et al.*, 2014).

No entanto, questões como manutenção de títulos protetores, funcionalidade de anticorpos induzidos e o papel de cada componente da resposta imune envolvidos na proteção, ainda permanecem sobinvestigação, uma vez que até hoje não está disponível uma vacina universal contra o meningococo que garanta a proteção de crianças e adultos de forma completa (Leca *et al.*, 2015).

Dados mostrando diminuição da eficácia da vacina entre 1 e 4 anos após a imunização de bebês e crianças, num momento em que eles podem montar robustas respostas de anticorpos memória, sugerem que a persistência de anticorpos séricos é mais importante na proteção do que a memória (Uria *et al.*; 2008).

Baseado em estudos prévios com vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B utilizando as VMEs, nos quais foi demonstrada a necessidade de três doses primárias para aumentar a persistência da resposta imune (Holst *et al.*, 2013), e em dados pré clínicos das duas vacinas brasileiras, nesse trabalho, para todos os grupos vacinais testados, utilizamos a mesma abordagem.

Utilizando a literatura como referência, podemos identificar o sucesso das vacinas de VMEs *tailor-made* utilizadas em surtos nos países como Cuba, Nova Zelândia e Noruega, e foram consideradas protetoras, em uma determinada área, devido a sua atividade bactericida frente a um painel de cepas circulantes local. No estudo realizado na Nova Zelândia em crianças com 6 semanas de idade, ensaios clínicos sugeriram que a resposta imune após três doses seria boa, mas que uma quarta dose aos 10 meses de idade foi necessária para induzir uma resposta similar como a observada em lactentes mais velhos. Em crianças, o uso de uma quarta dose 11-16 meses depois da administração da terceira dose, provocou uma forte resposta imune, demonstrando a importância de uma dose adicional da vacina em uma idade mais avançada (Holst *et al.*, 2009).

No estudo norueguês após a imunização primária com duas doses, os anticorpos bactericidas diminuíram ao longo dos próximos dez meses, o que coincidiu com o aparecimento de casos *break-through* no grupo vacinado. Em outro grupo do estudo que envolveu uma terceira dose de vacina, administrada dez meses após a segunda dose, foi demonstrado que uma forte resposta de reforço foi induzida, o que sugere que uma terceira dose da vacina é necessária para se obter um nível de proteção mais sustentada. O efeito de uma dose de reforço, 4-5 anos após a imunização primária com duas doses, havia sido estudado anteriormente em 27 adultos noruegueses. Este resultado de imunogenicidade da vacina de VME também mostrou um benefício substancial da imunização de reforço (Rosenqvist *et al.*, 1995).

Inicialmente a vacina combinada proposta, na forma líquida, foi submetida a um estudo de cinética após a terceira dose em camundongos. Para essa avaliação utilizamos a quantificação de anticorpos totais para as VMEs e para o PSC pelo método de ELISA, ensaio bactericida para cepas homólogas e heterólogas e índice de avides desses anticorpos.

Observamos pelo ELISA que os níveis de anticorpos de IgG total para as VMEs das cepas vacinais, N44/89 e N603/95, e para o PSC, aumentaram

significativamente a partir da 1^a dose de vacina, confirmando os resultados observados anteriormente para as vacinas monovalentes contra os sorogrupos B e C (Jessouroun *et al.*, 2004 ; Silveira *et al.*, 2007). Apesar dos títulos sofrerem uma pequena queda para os antígenos testados, em torno de 30 dias após a última dose, a quantidade de anticorpo circulante nos camundongos imunizados foram estáveis até o último tempo testado, 120 dias após a 1^a dose.

O ensaio de ELISA clássico desde que foi desenvolvido tem sido uma ferramenta importante na avaliação de vacinas na obtenção de marcadores de resposta imune como soroconversão e títulos protetores. No entanto, para avaliação de vacinas contra o meningococo tem sido utilizado como ensaio complementar aos ensaios que determinam atividade funcional dos anticorpos induzidos por estas vacinas. A atividade bactericida dos anticorpos, considerada padrão ouro na avaliação da resposta, tem correlação variável com os valores de IgG total induzidos, principalmente para polissacarídeos. Neste contexto, o ELISA de avidéz, que quantifica os anticorpos de maior avidéz aos antígenos parece ter uma correlação mais homogênea com a atividade bactericida dos anticorpos. Esta afirmação está amplamente descrita na literatura, tanto para polissacarídeos como para antígenos sub capsulares (Rosenqvist *et al.*,2001; Longworth *et al.*, 2002.)

Com o intuito de avaliar a qualidade de anticorpos circulantes, Granoff e colaboradores (1998) desenvolveram um ensaio de ELISA, utilizando um agente caotrópico. Diferentes substâncias caotrópicas podem ser utilizadas em concentrações e pH variados, capazes de causar alterações na força iônica das ligações antígeno-anticorpo, determinando a eluição de ligações fracas, ou seja, de baixa avidéz, enquanto moléculas com alta força de ligação não são eluídas. Os resultados da atividade funcional dos anticorpos produzidos por indivíduos imunizados, medida no ensaio de avidéz, apresentou correlação linear com a atividade bactericida nos soros.

Foi previamente mostrado que anticorpos com avidéz mais elevada são mais ativos em respostas imunológicas importantes, tais como a ativação do complemento e a opsonização (Rosenqvist *et al.*, 2013). Devido à característica de maturação das células B, o ensaio de avidéz é muito útil para a diferenciação entre as respostas imunes primárias e secundárias, e também tem sido utilizado para se estimar a eficácia ou falhas vacinais (de Souza *et al.*,2004).

A medição dos índices de avidéz dos anticorpos também foi usado como um marcador substituto para o desenvolvimento de memória imunológica e tem sido utilizada para estudar a imunogenicidade de conjugados (Shannon *et al.*, 2007).

Na avaliação do índice de avidéz dos anticorpos IgG contra os antígenos vacinais, observamos o aumento do mesmo, dose após dose. Para os anticorpos induzidos contra as VMEs o nível máximo de avidéz foi de 60%, 30 dias após a última dose, permanecendo estável até o final da avaliação. A avidéz dos anticorpos IgG contra o PSC também aumentou significativamente ao longo da imunização, atingindo o índice máximo de avidéz 15 dias após a última dose.

Vermont *et al.*(2002), utilizando NaSCN 1,5 M para a análise do índice de avidéz de anticorpos IgG produzidos após imunização com uma vacina de VME de meningococo B verificaram altos títulos de anticorpos funcionais que se correlacionaram fortemente com a atividade bactericida.

A atividade bactericida do soro tem se mostrado um importante marcador da imunidade correlacionada com a doença meningocócica. A indução de anticorpos bactericidas dependentes do complemento após a imunização com vacinas meningocócicas protéicas, polissacarídicas ou vacinas conjugadas, é considerada uma evidência aceitável da eficácia destas vacinas (Holst *et al.*, 2013).

Em 1976, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu critérios relacionados ao SBA para atender a alguns requisitos para a produção e liberação de vacina meningocócica polissacarídica. Para que uma vacina seja aceitável para o licenciamento, 90% dos indivíduos adultos imunizados devem ter um aumento de título bactericida em quatro vezes (aumento de 2 diluições) quando testado contra cepas alvo (Leca *et al.*, 2015).

Os antígenos imunodominantes em VME de *N. meningitidis* são as porinas PorA e PorB. Porém em cepas de um mesmo sorogrupo, existe uma grande variabilidade entre estas proteínas e, por conseguinte, a resposta imune as VMEs são sorosubtipo específicas (Acevedo *et al.*,2014). Em primeiro lugar, a heterogeneidade das proteínas intra sorogrupo, especialmente a proteína dominante PorA, dificulta o desenvolvimento de uma vacina universal (Leca *etal.*, 2015).

Os soros dos camundongos imunizados com a vacina combinada líquida foram submetidos à análise da atividade bactericida dos anticorpos para as cepas do sorogrupo B vacinais, sorogrupo B heterólogas e duas cepas do sorogrupo C. Os

anticorpos produzidos pela vacina combinada B e C conjugada apresentaram uma tendência para resposta dose dependente. Os títulos bactericidas para o sorogrupo B, em relação às cepas vacinais, foram maiores para a cepa N44/89 do que para a cepa N603/95. Esses dados estão em acordo com os resultados apresentados por Jessouroun e colaboradores (2004) e Tanazaki e colaboradores (2004). Para o sorogrupo C, os anticorpos contra a cepa C11, heteróloga a vacina, apresentaram títulos elevados e protetores até o final da análise.

Após a análise dos dados obtidos, a baixa atividade bactericida dos anticorpos induzidos para a segunda cepa vacinal (N603/95) e a cepa B heteróloga (2625), em relação aos valores observados para N44/89 sugeriram a necessidade da dose reforço. Foi então adotada para os experimentos subsequentes uma dose reforço 30 dias após a terceira dose.

Definida a dose reforço para a vacina combinada de forma líquida, foi levantada a questão sobre a forma de apresentação da vacina meningocócica C conjugada utilizada. A vacina que foi desenvolvida e avaliada no ensaio clínico de fase 2, tem sua forma farmacêutica liofilizada sendo reconstituída com hidróxido de alumínio no momento de administração. Por esse motivo, na avaliação de administração da dose reforço no desenvolvimento da resposta humoral induzida pela combinação entre as vacinas, foram incluídas as vacinas monovalentes C conjugada na forma líquida e liofilizada, assim como as combinações seguiram a mesma forma.

Na análise de IgG total para as duas VMES das cepas vacinais, a dose reforço foi positiva para as vacinas combinadas, em ambas as formulações. Porém a vacina combinada no momento da administração mostrou uma maior concentração de anticorpo, porém sem significância estatística ($p > 0,05$).

Ao analisar as concentrações de IgG total induzida para o PSC, tanto pelas vacinas monovalentes quanto para as combinadas, líquida e liofilizada, as vacinas se comportaram de maneira diferente, sendo que 30 dias após a dose reforço essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Contudo, assim como para as VMEs, a combinação no momento da administração se mostrou mais favorável.

A maturação da afinidade de anticorpos após a imunização primária ocorre em função do tempo e após inoculações repetidas, onde produzem uma maior concentração de anticorpos formados contra os antígenos protéicos que não induzem a lise bacteriana no SBA, porém podem induzir uma atividade opsonizante

(Holstet *al*, 2005). Alguns autores têm demonstrado que anticorpos contra o polissacarídeo capsular, com maior avidéz são mais ativos na indução da lise bacteriana mediada por complemento (Granoff & Pollard, 2007).

No presente estudo, após a dose reforço, a avaliação do IA dos anticorpos induzidos tanto pelas VMEs quanto para o PSC, para as vacinas combinadas e monovalentes, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$).

A combinação entre as vacinas favoreceu o IA para as VMEs vacinais, não havendo diferença entre as combinações liofilizadas e líquidas. Quando analisamos o IA dos anticorpos para o PSC, a vacina C conjugada e a vacina combinada, ambas na forma líquida, apresentaram um maior IA. 30 dias após a dose reforço, o IA dos anticorpos induzidos pela vacina combinada líquida, mostrou um menor declínio desse índice. Esses dados sugerem a participação do poder adjuvante das VMEs para a formação de resposta para o PSC.

Estudos com vacinas conjugadas contra diversas bactérias encapsuladas como pneumococos, Hib e estreptococos têm demonstrado a importância da avaliação da avidéz dos anticorpos produzidos, como um marcador do sucesso da imunização primária e estabelecimento de memória (Ruttimann *et al.*, 2014).

A maturação da afinidade de anticorpos após a imunização primária com ou sem dose-reforço ocorre em função do tempo e após administrações repetidas, onde produzem uma maior concentração de anticorpos e com maior especificidade aos antígenos alvos. Da mesma forma, após o esquema vacinal espera-se associado a maior especificidade e funcionalidade destes anticorpos.

Nesse estudo, a atividade bactericida dos anticorpos induzidos pelas vacinas, combinadas, frente às cepas B homólogas e heterólogas, apresentou uma tendência de aumento, em relação aos títulos obtidos com as vacinas monovalentes após a dose reforço. O aumento observado parece não ter sido expressivo uma vez que está dentro da faixa de equivalência definida para este ensaio (um \log_2 acima ou um \log_2 abaixo do título com 50% de lise). No entanto, os títulos obtidos após 30 dias a essa dose, permaneceram altos e protetores para a doença meningocócica causada por este sorogrupo. (Borrow & Carlone, 2001).

Para as cepas do sorogrupo C foram observados aumentos expressivos nos títulos bactericidas ($>2 \log_2$) e manutenção dos títulos elevados durante o tempo de observação, sugerindo benefício da combinação para a resposta à doença causada por este sorogrupo.

Apesar de este estudo ter sido desenvolvido em camundongos, resultados semelhantes em combinação de vacina B da Nova Zelândia com vacina C conjugada em adultos jovens, foram obtidos. Holmes e colaboradores (2007) observaram aumento significativo na resposta protetora para cepa B na vacina combinada em relação à B monovalente. Para o sorogrupo C (C11) a resposta protetora na combinação foi obtida em 100% dos vacinados.

Anticorpos bactericidas contra proteínas conservadas, geralmente não são encontrados após a vacinação com as VMEs. Os anticorpos são dirigidos contra proteínas variáveis ou não induzem proteção. A utilização de adjuvantes adequados podem também melhorar as respostas às vacinas de VME, exigindo menos doses para uma imunidade mais eficaz contra uma variedade mais ampla de proteínas. Do mesmo modo, os adjuvantes podem ser utilizados para modular a resposta imune e, assim, aumentar a eficácia da vacina em crianças mais jovens (Sanders & Feavers, 2011).

Os adjuvantes podem ser definidos como um grupo de compostos estruturalmente heterogêneos utilizados para induzir, aumentar ou modificar a resposta imunológica de um antígeno. Compostos de alumínio, como hidróxido (Al(OH)_3) e fosfato (AlPO_4), são utilizados como adjuvantes na maioria das vacinas licenciadas. As vacinas meningocócicas polissacarídicas conjugadas são adsorvidas em compostos de alumínio, embora a proteína carreadora também atue como um adjuvante, alterando as propriedades imunológicas do polissacárido para melhorar a eficácia.

Al(OH)_3 também tem sido considerado como responsável pelo o aumento da resposta de IgG para uma vacina VME em adultos, quando comparado com a vacina isoladamente. Em outro estudo, no entanto, apesar de adsorção de uma vacina de VME em Al(OH)_3 aumentar os níveis de IgG após duas doses, não houve um aumento significativo nos títulos de SBA quando comparado com duas doses de VME sozinha (Rosenqvist *et al.*, 1998).

De acordo com a natureza dos antígenos, o adjuvante deve ser racionalmente escolhido para induzir a resposta que melhor se correlaciona como mecanismo imunológico de proteção contra o agente patogênico em questão. A adsorção do antígeno pelo adjuvante é de extrema importância para a resposta imune, então quando se escolhe utilizar o sal de alumínio, a carga do antígeno e do adjuvante é uma consideração importante. A atração eletrostática muitas vezes é a força

dominante na adsorção do antígeno pelo adjuvante (al-Shakhshir *et al.*, 1995), porém as pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrófobas, e troca de ligantes também demonstraram participam dessa interação (Fox *et al.*, 2013). As vacinas estudadas nesse trabalho utilizaram o hidróxido de alumínio como adjuvante, porque ele é um dos dois únicos adjuvantes aprovados para uso em humanos.

A resposta imune induzida por adjuvantes compostos de sais de alumínio é predominantemente caracterizada pela participação de células T auxiliares Th2. O mecanismo de ação envolvido é a formação de um depósito que resulta na exposição prolongada do antígeno, levando a uma melhor resposta imune (Fox *et al.*, 2013).

O estudo feito em camundongos é o modelo amplamente usado para o estudo de adjuvantes, e as respostas de células T auxiliares são frequentemente categorizados como sendo Th1 ou Th2. Respostas Th1 são caracterizados pela imunidade mediada por anticorpos IgG, onde a troca de isotipo é para IgG2a, IgG2b e IgG3. Respostas Th2 são caracterizadas por mudar para IgG1, IgA e IgE (Sanders & Feavers, 2011). A morte eficaz de meningococos está associado com a ligação do complemento ao isotipo IgG2a e IgG2b (correspondente a IgG1 e IgG3 em seres humanos), e, conseqüentemente, com uma resposta predominantemente Th1 (Ruijne *et al.*, 2006)

Uma baixa relação entre IgG1/IgG2a indica uma resposta Th1. Adjuvantes para vacinas meningocócicas devem ser aqueles que promovem este tipo de resposta. Vale a pena salientar que embora a proporção dos isotipos de IgG induzida por um processo de vacinação possa diferir de acordo com o tipo da vacina, a determinação do isotipo induzido é essencial para a caracterização da resposta imune (Nagaputra *et al.*, 2014).

Na avaliação preliminar dos isotipos de IgG induzidos pelas vacinas experimentais, foram definidas as variações destes anticorpos dentro do repertório total de IgG. Observa-se que tanto as vacinas monovalentes como combinadas houve aumento de IgG1 e IgG2a após a dose reforço, com tendência mais acentuada para a vacina combinada com o componente C líquido. Para estes dois isotipos, verifica-se uma diminuição da concentração trinta dias após a dose reforço, porém menos acentuada para a vacina combinada com o componente C líquida que apresenta as maiores concentrações desde a imunização primária.

Para o isotipo IgG2b não se observa aumento da concentração após a dose reforço, exceto para a vacina combinada com componente C líquido. Após trinta dias da dose reforço observa-se uma tendência de queda nos títulos para vacinas monovalentes e não para as vacinas combinadas. Também para este isotipo a maior concentração de IgG2b foi para vacina combinada com o componente C líquido.

Para IgG3 não se observa aumento significativo para as vacinas monovalentes após dose reforço. No entanto, observa-se não só concentrações mais elevadas deste isotipo para as vacinas combinadas como também aumento após a dose reforço.

Considerando os isotipos fixadores de complemento, IgG2a, fundamental na resposta imune ao meningococo, os resultados sugerem superioridade das vacinas combinadas em relação as vacinas monovalentes. Sob o aspecto da indução de títulos de IgG total também as combinações induziram maiores títulos, o que podem representar diferente funcionalidade como anticorpos opsonizantes, não avaliados neste estudo e também importante na resposta imune ao meningococo.

Na análise da participação dos diferentes componentes na resposta imune induzida pelas vacinas experimentais, sob o ponto de vista dos diferentes isotipos, os resultados sugerem que as vesículas de membrana externa do componente B tiveram participação importante na combinação em relação às vacinas monovalentes.

Na avaliação da participação das duas vesículas na combinação, observa-se que as vacinas combinadas, com maior expressão para vacina com componente C líquido, houve um aumento dos títulos dos quatro isotipos estudados, desde a imunização primária e após a dose reforço. Após trinta dias da última dose os valores se mantem estáveis e mais elevados para as vacinas combinadas.

Os resultados sugerem melhor resposta ao polissacarídeo C já na vacina monovalente líquida para todos os isotipos de IgG estudados, tanto após imunização primária como após dose reforço. Da mesma forma os resultados indicam tendência de melhor resposta para a vacina combinada com o componente C líquido.

Observa-se que os títulos são mais elevados após imunização primária com vacina combinada, com o componente C líquido, para os isotipos induzidos embora em termos quantitativos não tenha sido detectada significância entre as duas vacinas combinadas após dose reforço exceto para o isotipo IgG2b.

Os títulos mais elevados desde a imunização primária observados para a vacina combinada com o componente C líquido podem ter sido os responsáveis pelo aumento de avidéz dos anticorpos detectada para esta vacina. Os resultados sugerem benefício da combinação das duas vacinas para todos os antígenos estudados e preferencialmente para a combinação líquida.

Os resultados indicam a possibilidade de contribuição de resposta Th1, característica das vesículas de membrana externa, mesmo numa vacina combinada cujo adjuvante de alumínio privilegia a resposta Th2. No entanto, estudos com o objetivo de discriminar esta contribuição devem ser feitos sem a presença do adjuvante de alumínio e pesquisa de citocinas características destes dois tipos de resposta.

A indicação de que a combinação líquida pode ser mais interessante do que a que utiliza o componente C conjugado liofilizado, pode estar relacionada com o tempo de ressuspensão das duas vacinas no momento da administração nos animais. A vacina combinada com o componente C líquido permite maior tempo de contato com o adjuvante de alumínio, o qual pode modificar a interação dos antígenos com o mesmo e conseqüentemente ter impacto na forma de sua apresentação ao sistema imune. Para elucidação desta questão estudos de interação dos diferentes componentes com o adjuvante devem ser realizados.

As vacinas testadas nesse trabalho foram capazes de desenvolver altos títulos de isotipos de IgG responsáveis pela ativação do complemento. Esses dados fortalecem os resultados da atividade bactericida proporcionada por essas vacinas frente às cepas bacterianas correspondentes.

Com a combinação entre as vacinas meningocócicas B e C conjugada observamos uma menor relação entre IgG1 e IgG2a, para a vacina combinada na forma líquida, trinta dias após a dose reforço, indicando uma resposta Th1 maior do que a induzida pelas outras vacinas.

Romeu e colaboradores, em 2014, comprovaram o efeito adjuvante das vesículas em estudo da resposta imune induzida por preparações testes destes antígenos combinados a polissacarídeo A ou vacina A conjugada. Embora as vacinas testadas estivessem adsorvidas em hidróxido de alumínio, indutor preferencial de resposta Th2, eles observaram resposta Th1, característica dos componentes das vesículas (Romeu *et al.*, 2014).

O aumento da concentração dos isotipos induzidos pelas vacinas combinadas em relação as monovalentes correspondentes, nos sugere a importante participação das VMEs na combinação, onde podemos observar sua contribuição para a modulação da resposta imune. Apesar de IgG2a ser o isotipo mais efetivo em ativar complemento e promover a ligação ao receptor FcγRI em células fagocíticas, no modelo murino, o isotipo IgG2b também é um bom indutor de lise bacteriana. Além disto, o mecanismo adicional envolvido poderia ser a opsonofagocitose, via receptores específicos para IgG2b e IgG1 (Romeu *et al.*, 2014).

O LOS meningocócico, encontrados em vacinas de VME, se liga a TLR-4, garantindo a indução de anticorpos bactericidas eficazes contra proteínas da membrana externa (Nagaputra *et al.*, 2014). No entanto, para diminuição do nível de toxicidade do LOS nas VMEs, no processo de purificação é utilizado detergente, o qual também remove algumas lipoproteínas tal como fHBP da membrana (Steeghs *et al.*, 1999). Mais investigações sugerem que o uso de VMEs (com pequenas quantidades de LOS do tipo nativo) resulta, geralmente, em uma proteção melhor do que outras formulações de vacina com adjuvante. Isto provavelmente ocorre porque as VMEs possuem mecanismos adjuvantes, como o LOS e algumas porinas nativas.

As VMEs também apresentam a função de reter antígenos protéicos na sua conformação nativa, e a capacidade de combinar o antígeno e o adjuvante dentro da mesma estrutura. Estas propriedades levaram à investigação do proteolipossoma meningocócico e seus derivados cocleares como adjuvantes de vacinas contra outros agentes patogênicos, incluindo a malária e herpes (Sanders & Feavers, 2011).

Estudos de uso de VMEs como adjuvantes mostraram seu uso potencial em futuras vacinas. As VMEs provocaram níveis semelhantes de IgG específicos ao toxóide tetânico como o hidróxido de alumínio, que tem sido utilizado com sucesso em vacinas para humanos, sugerindo que as VMEs meningocócicas podem ser um adjuvante alternativo para antígenos protéicos não meningocócicos, com o benefício adicional de fornecer alguma proteção contra a doença meningocócica.

Para se testar a eficácia da vacina desenvolvida é necessária a realização de ensaios que possam avaliar a proteção de animais imunizados em modelos de infecção experimental. Estes ensaios *in vivo* são capazes de modular os eventos que ocorrem na presença de organismos patogênicos vivos. Entretanto, tais

modelos animais não são ideais e nem sempre reproduzem a doença humana, como acontece com a doença meningocócica.

N. meningitidis não é capaz de colonizar e induzir doença em camundongos, principalmente porque não consegue retirar ferro de proteínas transportadoras de ferro do animal, que é necessário para a sua multiplicação na corrente sanguínea. Por outro lado, camundongos tratados com ferro podem ser infectados com meningococos e desenvolvem uma doença aguda e fatal (Tsai, Dyer & Sparling, 1988). Esta intervenção é capaz de assegurar o crescimento do microrganismo e a indução de morte por choque endotóxico, devido à liberação de grandes quantidades de vesículas de membrana externa contendo LOS e citocinas pró-inflamatórias (Jessouroun *et al.*, 2004).

O modelo hiperferrêmico de infecção com meningococo grupo B foi desenvolvido por Sifontes e colaboradores (1997), onde camundongos imunizados com a vacina VA-MENGOC-BC® foram protegidos do desafio com diferentes cepas do grupo B, isoladas de casos clínicos. Posteriormente, Jessouroun e colaboradores (2004), utilizando o mesmo modelo murino, demonstraram a proteção de animais imunizados com uma vacina brasileira contra o grupo B, contendo OMVs e LOS detoxificado, de infecção meningocócica e choque séptico, induzidos por cepas homólogas e heterólogas. Os autores concluíram que o modelo animal é similar à doença em humanos e propuseram a inclusão da medida de marcadores de sepse para avaliação dos efeitos protetores de imunógenos (Jessouroun *et al.*, 2004). Estes estudos foram utilizados para a adaptação do modelo murino na avaliação da proteção induzida pelas diferentes formulações vacinais desse estudo. Para o ensaio de desafio foram utilizadas as cepas homólogas e heteróloga de *N. meningitidis* grupo B (N44/89, N603/95 e 2625) e C (2135).

As vacinas estudadas que continham VMEs foram capazes de induzir taxas de sobrevivência superiores a 70% de proteção efetiva, quando desafiadas com N44/89, já para a vacina combinada, essa taxa de proteção foi de 96%. Porém para a cepa N603/95, a taxa de proteção foi em média de 22% para a vacina monovalente e para a combinada. Esse resultado, mais uma vez, demonstra a baixa imunogenicidade da cepa N603/95. Já para o desafio com a cepa C 2135, para a vacina monovalente a taxa de proteção foi de 96%, enquanto para a combinada a taxa de proteção foi de 100%. Para todos os ensaios desafio, a infecção meningocócica nos camundongos imunizados e no grupo controle, foi induzida por uma suspensão bacteriana

correspondente a 1 DL50, após 3 imunizações primárias e uma dose reforço. A taxa de proteção dos animais imunizados com a vacina combinada foi satisfatória tanto para as cepas de meningococo B, quanto C; esses resultados sugerem a participação de anticorpos protetores mantidos após o período de imunização.

7 CONCLUSÕES

A combinação das vacinas meningocócicas B e C conjugada induziu uma resposta de anticorpos com títulos mais elevados para todos os antígenos vacinais componentes das duas vacinas, após esquema de imunização primária e dose reforço, em relação as vacinas monovalentes. O mesmo foi observado para o aumento dos isotipos de IgG estudados (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), privilegiando a combinação das vacinas monovalentes.

O aumento dos títulos de anticorpos bactericidas não acompanhou o que foi observado nos outros ensaios pela limitação do teste, que identifica grandes diferenças. No entanto, observamos uma tendência de aumento nas vacinas combinadas.

Os anticorpos de camundongos imunizados com a vacina combinada, na forma líquida, apresentaram elevados índices de avidéz em presença de agente desnaturante, após repetidas injeções, demonstrando o sucesso da imunização primária e estabelecimento de maturação da afinidade após a dose reforço.

A vacina meningocócica B e C combinada induziu altos títulos dos isotipos IgG1 e IgG2a contra o PSC, demonstrando a conversão da natureza da resposta imune a uma forma dependente de células T auxiliares.

Os resultados indicam a importância da combinação dos dois componentes, para o aumento de resposta Th1, que pode produzir títulos mais elevados de anticorpos, maior especificidade e funcionalidade destes. Os resultados de todos os testes realizados sugerem um melhor desempenho para a vacina combinada na forma líquida.

As propriedades adjuvantes das vesículas ficaram evidenciadas devido a razão IgG1/IgG2a resposta característica Th1, ter sido encontrada nas amostras de soros. Embora, as vacinas testadas estivessem adsorvidas em hidróxido de alumínio, indutor preferencial de resposta Th2.

As vacinas testadas nesse trabalho foram capazes de induzir taxas superiores a 70% de proteção de camundongos imunizados e desafiados com primeira cepa prevalente, N44/89, e uma menor proteção para a segunda cepa prevalente, N603/95. Já para as cepas heterólogas, 2625, a proteção foi de 60%, após a imunização primária e dose reforço, sugerindo a manutenção de resposta humoral contra o imunógeno.

No aspecto de funcionalidade seria importante avaliar a capacidade opsonizante dos anticorpos para uma resposta mais completa sobre a combinação.

A vacina combinada na forma líquida, desenvolvida no presente estudo, mostrou-se imunogênica em camundongos e, portanto, apresenta potencial para uso em seres humanos.

O estudo realizado cumpriu seus objetivos, acentuando a importância da proposta inicial dos projetos de desenvolvimento de vacinas brasileiras contra os sorogrupos B e C conjugada do meningococo, o qual pretendia ter as duas vacinas licenciadas para administração conjunta, segundo o Ministério da Saúde, o que motivou este trabalho. Apesar da prevalência do sorogrupo C no país, nas faixas etárias de maior incidência da doença meningocócica, o sorogrupo B continua de ocorrência importante em crianças de faixa etária menor que 5 anos. A combinação das duas vacinas seria uma intervenção importante neste quadro epidemiológico.

8 REFERÊNCIAS

ACEVEDO R.; FERNÁNDEZ S.; ZAYAS C.; ACOSTA A.; SARMIENTO M.E.; FERRO V.A.; ROSENQVIST E.; CAMPA C.; CARDOSO D.; GARCIA L. E PEREZ J.L. **Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications.** Front. Immunol.; v.5, p.121, 2014.

ALAMRO, M.; BIDMOS, F.A.; CHAN, H.; OLDFIELD, N.J.; NEWTON, E.; BAI, X.; AIDLEY, J.; CARE, R.; MATTICK, C.; TURNER, D.P.; NEAL, K.R.; ALA'ALDEEN, D.A.; FEAVERS, I.; BORROW, R.; BAYLISS, C.D. **Phase Variation Mediates Reductions in Expression of Surface Proteins during Persistent Meningococcal Carriage.** Infect Immun.; v.82, n.6, p. 2472–2484, 2014.

AL-SHAKHSHIR R.H.; REGNIER F.E.; WHITE J.L.; HEM S.L. **Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants.** Vaccine.; v.13, n.1, p.41-4, 1995.

ARIGITA, C., JISKOOT, W., GRAAF, M. R., KERSTEN, G. F. A. **Methods in molecular medicine, vol. 66: Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols** Edited by: A. J. Pollard and M. C. J. Maiden. Cap. 6, pág. 61-79. © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001.

BARROSO, D.E.; CARVALHO, D.M.; CASAGRANDE, S.T.; REBELO, M.C.; SOARES, V.; ZAHNER, V.; SOLARI, C.A.; NOGUEIRA, S.A. **Microbiological epidemiological history of meningococcal disease in Rio de Janeiro, Brazil.** Braz J Infect Dis; v.14, n.3, p.242-251, 2010.

BASTOS, R.C. **Síntese, purificação e caracterização físico-química do conjugado de polissacarídeo meningocócico C com anatoxina tetânica.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

BASTOS, R.C.; CARVALHO, J.M.; SILVEIRA, I.A.F.B.; JACOB, S.C.; LEANDRO, K.C. **Determination of hydrazine in a meningococcal C conjugate vaccine intermediary product.** Vaccine, v. 28, p. 5648–5651, 2010.

BEDDEK, A.J., LI, M.S., KROLL, J.S., JORDAN, T.W., MARTIN, D.R. **Evidence for capsule switching between carried and disease-causing *Neisseria meningitidis* strains.** Infect Immun., v. 7, n. 7, p. 2989-94, 2009.

BEUVERY, E.C.; KAADEN, A.; KANHAI, V.; LEUSSINK, A.B. **Physicochemical and immunological characterization of meningococcal serogroup polysaccharide-tetanus toxoid conjugates prepared by two methods.** Vaccine, v.1, p. 31-36, 1983.

BILLKER, O.; GODERT, S.; MEYER, T.F. **Interactions of *Neisseria meningitidis* with the immune system.** In: Ferreiros C, Criado MT, Vazquez J, editors. Emerging strategies in the fight against meningitis molecular and cellular aspects. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press; p. 39-54, 2002.

Bio-Manguinhos 2007. Disponível

em:<http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=156#>

BJUNE, G.; GRONNESBY, J.K.; HOIBY, E.A.; CLPSS, O.; NOKLEBY, H. **Results of an efficacy trial with an outer membrane vesicle vaccine against systemic serogroup B meningococcal disease in Norway.** NIPH Ann. v. 14, p. 125-130, 1991.

BORROW, R., CARLONE, G.M. **Serogroups B and C serum bactericidal assays.. Methods in molecular medicine, vol. 66: Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols.** Edited by: A. J. Pollard and M. C. J. Maiden. Cap.20, pág. 291-304. © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001.

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

BRODEUR, B.R.; TSANG, P.S.; HAMEL, J.; LAROSE, Y.; MONTPLAISIR, S. **Mouse models of infection for *Neisseria meningitidis* B, 2b and *Haemophilus influenzae* type b diseases.** Can J Microbiol.v.32, n.1, p.33-7, 1986.

CATLIN, B.W. **Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing.** J Infect Dis., v. 128, n. 2, p. 178-94, 1973.

CHEN, A.; SEIFERT, H.S. **Interactions with host cells causes *Neisseria meningitidis* Pili to Become Unglued.** Front Microbiol.v. 2, p.66, 2011.

CHU, C., SCHNEERSON, R., ROBBINS, J.B. & RASTOGI, S.C. **Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates.** Infect. Immun.,v. 40, p. 245-256, 1983.

CLAASSEN, I.; MEYLIS, J.; VAN DER LEY, P.; PEETERS, C.; BRONS, H.; ROBERT, J.; BORSBOOM, D.; VAN DER ARK, A.; VAN STRAATEN, I.; ROHOLL, P.; KUIPERS, B.; POOLMAN, J. **Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine.** Vaccine.v.14, n.10, p.1001-8, Jul.1996.

COHN, A.C.; MACNEIL, J.R.; HARRISON, L.H.; HATCHER, C.; THEODORE, J.; SCHMIDT, M.; PONDO, T.; ARNOLD, K.E.; BAUMBACH, J.; BENNETT, N.; STEPHENS, D. AND MESSONNIER, N.E. **Changes in *Neisseria meningitidis* disease epidemiology in the United States, 1998–2007: Implications for prevention of meningococcal disease.** Clin Infect Dis. v.50, n.2, p. 184-191, 2010.

COUREUIL, M.; JOIN-LAMBERT, O.; LÉCUYER, H.; BOURDOULOUS, S.; MARULLO, S.; NASSIF X. **Pathogenesis of Meningococemia**. Cold Spring Harb Perspect Med. v. 3, n.6. 2013.

DAGAN, R. **Present and future of combined vaccines**. Vacunas; v.6, p.135-137, 2005.

DANZIG, I. **Meningococcal vaccines**. Pediatr.Infect. Dis. J., v.23, Suppl. 1, S285-S292,2004.

DE FILIPPIS, I.; LEMOS, A.P.S.; HOSTETLER, J.B.; WOLLENBERG, K.; SACCHI, C.T.; HARRISON, L.H.; BASH, M.C.; PREVOTS, R. **Molecular Epidemiology of *Neisseria meningitidis* Serogroup B in Brazil**. PLoS ONE, v.7, n.3, p. 1-10, 2012.

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

DE MORAES, J.C.; PERKINS, B.A.; CAMARGO, M.C.; HIDALGO, N.T.; BARBOSA, H.A.; SACCHI, C.T.; LANDGRAF, I.M.; GATTAS, V.L.; VASCONCELOS, H.G.; GRAL, I.M. **Protective efficacy of serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil**. Lancet; v.340, p.1074- 1078, 1992.

DE VOE, I.W. **The meningococcus and mechanisms of pathogenicity**. Microbiol.Rev. v.46, p.162-190, 1992.

DE VOE, I.W., GILCHRIST, J.E. **Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis***. J. Exp.Med, v.138, p.1156-1166, 1973.

DEGHMANE, A.E., PETIT, S., TOPILKO, A., PEREIRA, Y., GIORGINI, D., LARRIBE, M., TAHA, M.K. **Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator**. EMBO J., v. 19, n. 5, p. 1068-78, 2000.

DWILOW, R., FANELLA, S. **Invasive Meningococcal Disease in the 21st Century—An Update for the Clinician**. Curr Neurol Neurosci Rep., v.15, n.3, p.2, Mar, 2015.

EMONTS, M; HAZELZET, J.A.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W. **Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections**. Lancet Infect Dis. v.3, n.9, p.565-577, Sep. 2003.

ENGLISH, M.; MACLENNAN, J.M.; BOWEN-MORRIS, J.M.; DEEKS, J.; BOARDMAN, M.; BROWN, K. **A randomized, double-blind, controlled trial of the immunogenicity and tolerability of a meningococcal group C conjugate vaccine in young British infants**. Vaccine, v.19, n.9-10, p. 1232-1238, 2000.

FEAVERS, I.M.; PIZZA, M. **Meningococcal protein antigens and vaccines.** *Vaccine*; v.27 Suppl 2, p.42-50, 2009.

FOX, C.B.; KRAMER, R.M.; BARNES, V.L.; DOWLING, Q.M.; VEDVICK, T.S. **Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants.** *Ther Adv Vaccines*. V.1, n.1, p. 7–20. May. 2013

FRANSEN, F.; HECKENBERG, S.G.; HAMSTRA, H.J.; FELLER, M.; BOOG, C.J.; VAN PUTTEN, J.P.; VAN DE BEEK, D.; VAN DER ENDE, A.; VAN DER LEY, P. **Naturally occurring lipid a mutants in *Neisseria meningitidis* from patients with invasive meningococcal disease are associated with reduced coagulopathy.** *PLoS Pathog*. v. 5, n.4, e1000396, 2009.

FRASCH, C.E. **Meningococcal vaccines: past, present and future.** In: **Meningococcal Disease** edited by Keith Cartwright, copyright by John Wiley&Sons, 1995, Baffins Lane, Chichester, West Susset PO19 1UD, England.

FRASCH, C.E., MENELIS, R.N. & GOTSCHLICH, E.C. **Strain-specific variation in the protein and lipopolysaccharide composition of the group B meningococcal outer membrane.** *J. Bacteriol.*, v.127, p. 973-981, 1976.

FRASCH, C.E.; TSAI, C.M.; MOCCA, L.F. **Outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: structure and importance in meningococcal disease.** *Clin Invest Med*. v.9, p.101-107, 1986.

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

GASPARINI, R.; AMICIZIA, D.; LAI, P.L.; PANATTO, D. ***Neisseria meningitidis*, pathogenetic mechanisms to overcome the human immune defences.** *J Prev Med Hyg*. v. 53, n.2, p. 50-5., Jun. 2012.

GHEESLING, L.L., CARLONE, G.M., PAIS, L.B., HOLDER, P.F., MASLANKA, S.E., PLIKAYTIS, B.D., ACHTMAN, M., DENSEN, P., FRASCH, C.E., KAYHTY, H., et al. **Multicentre comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup C anti-capsular polysaccharide antibody levels measured by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 1475-1482, 1994.

GOLDBLATT, D. **Simple solid phase assays of avidity.** In: *Immunochemistry 2: a practical approach.* Turner, M.W. & Jonh-stone A.P. (Eds.), Oxford: IRL Press at Oxford University Press, p.31-51, 1997.

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. **Human immunity to the meningococcus. I. The role of human antibodies.** *J. Exp. Med.*v. 129, p.1307-26, 1969(a).

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. **Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity.** *J Exp Med*. v.129, n.6, p.1327-1348, 1969(b).

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. **Human immunity to the meningococcus.V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the Carrier State.** J.Exp. Med.v.129, p. 1385-95, 1969(c).

GOTSCHLICH, E.C. **Neisseria In: Microbiology** Bernard D. Davis et al. 4th edition, 1993; J. Lippincott Company, Philadelphia, USA.

GOTSCHLICH, E.C.; GOLDSCHNEIDER, I.; ARTENSTEIN, M.S. **Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers.** J. Exp. Med, v.129. p. 1367-138, 1969.

GRANOFF, D.M. **Relative importance of complement-mediated bactericidal and opsonic activity for protection against meningococcal disease.** Vaccine, v.27, S B117-125, 2009.

GRANOFF, D.M., POLLARD, A.J.**Reconsideration of the use of meningococcal polysaccharide vaccine.**Pediatr Infect Dis J., v. 26, n. 8, p. 716-22, 2007.

GRANOFF, D.M.; GUPTA, R.K.; BELSHE, R.B.; ANDERSON, E.L. **Induction of immunologic refractoriness in adults, by meningococcal C polysaccharide vaccination.**J. Infect. Dis., v.178, p. 870-874, 1998.

GRIFFISS, J.M. **Mechanisms of host immunity. In: Meningococcal Disease.** Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, p.35-70, 1995.

HAHNÉ, S.J., GRAY, S.J., JEAN-FRANÇOIS, A., CROWCROFT, N.S., NICHOLS, T., KACZMARSKI, E.B., RAMSAY, M.E.**W135 meningococcal disease in England and Wales associated with Hajj 2000 and 2001.** Lancet. v. 359, n. 9306, p. 582-3. 2002.

HALPERIN, S.A., BETTINGER, J.A., GREENWOOD, B., HARRISON, L.H., JELFS, J., LADHANI, S.N., MCINTYRE, P., RAMSAY, M.E., SÁFADI, M. A. **The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease.** Vaccine. v. 30; Suppl 2:B26-36, 2012.

HARRIS, S.L.; TSAO, H.; ASHTON,L.; GOLDBLATT, D.; FERNSTEN, P. **Avidity of the immunoglobulin g response to a *Neisseria meningitidis* group c polysaccharide conjugate vaccine as measured by inhibition and chaotropic enzyme-linked immunosorbent assays.** Clinical and vaccine immunology, v.14, n.4, p. 397-403, Apr., 2007.

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

HARRISON, L.H.; TROTTER, C.L.; RAMSAY, M.E.**Global epidemiology of meningococcal disease.** Vaccine, v. 27, p. B51-63, 2009.

HARRISON, O.B.; CLAUS, H.; JIANG, Y.; BENNETT, J.S.; BRATCHER, H.B.; JOLLEY, K.A.; CORTON, C.; CARE, R.; POOLMAN, J.T.; ZOLLINGER, W.D.;

FRASCH, C.E.; STEPHENS, D.S.; FEAVERS, I.; FROSCHE, M.; PARKHILL, J.; VOGEL, U.; QUAIL, M.A.; BENTLEY, S.D.; MAIDEN, M.C. **Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus.** Emerg Infect Dis., v. 19, n.4, p. 566-73, Apr.2013 .

HEDARI, C. P.; KHINKARLY, R. W.; DBAIBO, G. S. **Meningococcal serogroups A, C, W135, and Y tetanus toxoid conjugate vaccine: a new conjugate vaccine against invasive meningococcal disease.** Infect Drug Resist.v.3, n. 7, p. 85-99, Apr. 2014.

HOIBY E.A.; ROSENQVIST, E.; FROHOLM, L.O.; BJUNE, G.; FEIRING, B.; NOKLEBY, H; RONNILD, E. **Bactericidal antibodies after vaccination with the Norwegian meningococcal serogroup B outer membrane vesicles vaccine; a briefly survey.** NIPH Ann., v. 14, p. 147-156, 1991.

HOLMES, J.D., MARTIN, D., RAMSAY, C., YPMA, E., OSTER, P. **Combined administration of serogroup B meningococcal vaccine and conjugated serogroup C meningococcal vaccine is safe and immunogenic in college students.** Epidemiol Infect., v. 136, n. 6. P. 790-9, 2008, Epub 2007 Aug 3.

HOLST, J.; FEIRING, B.; NAESS, L.M.; NORHEIM, G.; KRISTIANSEN, P.; HØIBY, E.A.; BRYN, K.; OSTER, P.; COSTANTINO, P.; TAHA, M.K.; ALONSO, J.M.; CAUGANT, D.A.; WEDEGE, E.; AABERGE, I.S.; RAPPUOLI, R.; ROSENQVIST E. **The concept of *tailor-made*, protein-based, outer membrane vesicle vaccines against meningococcal disease.** Vaccine.v. 18, n. 23(17-18), p. 2202-5, Mar. 2005.

HOLST, J.; MARTIN, D.; ARNOLD, R.; HUERGO, C.C.; OSTER, P.; O'HALLAHAN, J.; ROSENQVIST, E. **Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*.** Vaccine, v. 27, Suppl 2, p. B3-12, 2009.

HOLST, J.; OSTER, P.; ARNOLD, R.; TATLEY, M.V.; NÆSS, L.M.; AABERGE, I.S.; GALLOWAY, Y.; MCNICHOLAS, A.; O'HALLAHAN, J.; ROSENQVIST, E.; BLACK, S. **Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future.** , v. 9, n. 6, p. 1241-53, Jun 2013.

HOMMA, A. **The Brazilian manufacturers' perspective and its current status.** Biologicals, v. 37, p. 173-176, 2009.

HOMMA, A.; LEAL, M.L.F.; MOREIRA, M.S.; PINA, F.O.; BAETAS, R.B.G.; PIZARRO, A.P.B.; COUTO, A.R. **Desenvolvimento e produção de vacinas no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fiocruz.** In: Vacinas, soros e imunizações no Brasil. Buss, Paulo Marchiori; Temporão, José Gomes; Carvalheiro, José da Rocha. Vacinas, soros & imunizações no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, p.349-378, 2005.

HOMMA, A.; MARTINS, R.M.; LEAL, M.L.F.; FREIRE, M.S.; COUTO, A.R. **Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 2, p. 445-458, 2011.

ISER, B.P.;LIMA, H.C.;DE MORAES,C.;DE ALMEIDA, R.P.;WATANABE, L.T.;ALVES, S.L.;LEMOS, A.P.;GORLA, M.C.; GONÇALVES, M.G.;DOS SANTOS, D.A.;SOBEL, J. **Outbreak of *Neisseria meningitidis* C in workers at a large food processing plant in Brazil: challenges of controlling disease spread to the larger community.** *Epidemiol Infect.*, v. 140, p. 906-915, 2011.

JENNINGS, H.J.; LUGOWSKI, C. **Immunochemistry of serogroups A, B and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates.** *J.Immunol.*, v. 127, p. 1011-1018, 1981.

JESSOUROUN, E. **Obtenção de antígenos não-capsulares de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B prevalente no Brasil e avaliação do seu potencial vacinal em camundongos suíços.** 2001. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) –Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

JESSOUROUN, E.; SILVEIRA, I.F.B.;LARANJEIRA, A.P.; PEREIRA, S.; FERNANDES, S.A.; RABINOVITCH, L.; FRASCH, C.E.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. **Outer membrane vesicles (VMEs) and detoxified lipooligosaccharide (dLPS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock.** *Vaccine* , v. 22, p. 2617–2625, 2004.

JÓDAR, L., GRIFFITHS, E. & FEAVERS, I.M. **Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines.** *Vaccine*, v. 22, p. 1047-1053, 2004.

JOLLEY, K. A. & MAIDEN, M. C. J. **BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level.** *BMC Bioinformatics*, 11:595, 2010.

JONES, C.; CRANE, D.T.; LEMERCINIER, B.; BOLGIANO, B.; YOST, S.E. **Physicochemical studies of the structure and stability of polysaccharide-protein conjugate vaccines.** *Dev. Biol. Stand. Basel Karger.*, v. 87, p. 143-151, 1996.

JONES, G.R., CHRISTODOULIDES, M., BROOKS, J.L., MILLER, A.R., CARTWRIGHT, K. A.,HECKELS, J.E. **Dynamics of carriage of *Neisseria meningitidis* in a group of military recruits: subtype stability and specificity of the immune response following colonization.** *J Infect Dis.*, v. 178, n. 2, p. 451-9, 1998.

KAAIJK, P.; VAN DER ENDE, A.; LUYTJES, W. **Routine vaccination against MenB: considerations for implementation.** *Hum Vaccin Immunother.*, v. 10, n. 2, p. 310-6, 2014.

KHATAMI, A.; POLLARD, A.J. **The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines.** *Expert reviews of vaccines*, v. 9, p. 285-298, 2010.

LECA, M.; BORNET, C.; MONTANA, M.; CURTI, C.; VANELLE, P. **Meningococcal vaccines: Current state and future outlook**. *Pathol Biol.*, v. 63, n. 3, p. 144-51, Jun. 2015.

LEE CHE-H R, FRASCH CE. **National Institute of Health. Polysaccharide-protein conjugate vaccines**. Patent pending, US 60/493, 389; WO 2005/014,037 A2, 2005.

LEMONS, A.P.; BRANDÃO, A.P.; GORLA, M.C.; PAIVA, M.V.; SIMONSEN, V.; MELLES, C.E. **Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001**. *J Med Microbiol.*, v. 55, n. 6, p. 751–757, 2006.

LEWIS, L.A. & RAM, S. **Meningococcal disease and the complement system**. *Virulence.*, v.1, n. 5(1), p. 98-126, Jan. 2014.

LGIETSEME, J.U.; EKO, F.O.; HE, Q.; BLACK, C.M. **Combination vaccines: design strategies and future trends**. *Expert Rev Vaccines*, v. 5, n. 6, p. 739-745, 2006.

LONGWORTH, E.; BORROW, R.; GOLDBLATT, D.; BALMER, P.; DAWSON, M.; ANDREWS, N.; MILLER, E.; CARTWRIGHT, K. **Avidity maturation following vaccination with a meningococcal recombinant hexavalent PorA OMV vaccine in UK infants**. *Vaccine*, v. 20, n. 19-20, p. 2592-6, 2002.

MARCEAU, M., BERETTI, J.L., NASSIF, X. **High adhesiveness of encapsulated *Neisseria meningitidis* to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili**. *Mol Microbiol.*, v. 17, n. 5, p. 855-63, 1995.

MARIN, M.; BRODER, K.R.; TEMTE, J.L.; SNIDER, D.E.; SEWARD, J.F. **Use of combination measles, mumps, rubella, and varicella vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)**. *MMWR Recomm Rep.*, v. 59, n. RR-3, p. 1-12, 2010.

MARTINS, F.O. **Avaliação da resposta humoral, em animais de experimentação, induzida pela combinação da vacina DTP-Hib com as vacinas meningocócicas B e C conjugada, desenvolvidas em Bio-manguinhos**. (Tese) Mestrado Profissional de Tecnologia de Imunobiológicos, Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011.

MASSARI, P; RAM, S; MACLEOD, H; WETZLER, LM. **The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity**. *Trends in Microbiol*, v.11, n. 2, p.87-93, 2003.May, 2000.

MEHTA, O.H., NORHEIM, G., HOE, J.C., ROLLIER, C.S., NAGAPUTRA, J.C., MAKEPEACE, K. **Adjuvant effects elicited by novel oligosaccharide variants of detoxified meningococcal lipopolysaccharides on *Neisseria meningitidis* recombinant PorA protein: a comparison in mice**. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12: e115713, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0115713

MERZ, A.J.; SO, M.; SHEETZ, M.P. **Pilus retraction powers bacterial twitching motility.** Nature, v. 407, p. 98-102, 2000.

MILAGRES, L.G.; BRANDILEONE, M.C.C.; SACCHI, C.T.; VIEIRA, V.S.D.; ZANELLA, R.C.; FRASCH, C.E. **Immune response of mice to a Brazilian group B vaccine.** FEMS Immunol. Med. Microbiol., v.561, p. 1-9, 1995.

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

MOGENSEN, T. H. **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.** Clin Microbiol Rev., v. 22, n. 2, p. 240-73, 2009.

MORAES, J.C.; BARATA, R.B. **Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century XX: epidemiological characteristics.** Cad Saude Publica, v.21, p. 1458–1471, 2005.

MORAES, J.C.; KEMP, B.; LEMOS, A.P.; GORLA, M.C.O.; MARQUES, E.G.; FERREIRA, M. C.; SACCHI, C.; CARVALHANAS, T.R.; RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C.M.; SALGADO, M.M.; FUKASAWA, L.; GONÇALVES, M.G., HIGA, F., ANGERAMI, R., FREITAS, A.R., SATO, H.K., SÁFADI, M.A. **Prevalence, risk factors and molecular characteristics of meningococcal carriage among brazilian adolescents.** Ped. Infect. Dis. J.I, v. 34, n. 11, pag. 1197-1201, 2015.

MORLEY, S.L., POLLARD, A.J. **Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon?** Vaccine. v. 12, n. 20(5-6), p. 666-87, 2001.

NAGAPUTRA, J.C.;ROLLIER, C.S.;SADARANGANI, M.;HOE, J.C.;MEHTA, O.H.;NORHEIM, G.;SALEEM, M.;CHAN, H.;DERRICK, J.P.;FEAVERS, I.;POLLARD, A.J.;MOXON, E.R. ***Neisseria meningitidis* native outer membrane vesicles containing different lipopolysaccharide glycoforms as adjuvants for meningococcal and nonmeningococcal antigens.**Clin Vaccine Immunol., v.21, n.2, p. 234-42, Feb. 2014.

NORMANDO, D., TJÄDERHANE, L., CÁTIA QUINTÃO, C. C. A. **A escolha do teste estatístico – um tutorial em forma de apresentação em PowerPoint.** Dental Press J. Orthod., v. 15, n. 1, p. 101-106, Jan./Feb. 2010.

NORONHA, C.P. **Avaliação da eficácia da vacina anti-meningocócica BC no Rio de Janeiro: um estudo caso-control.** (Tese) Mestrado em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública / ENSP, Rio de Janeiro 1-232, 1993.

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

OVIEDO-ORTA, E., AHMED, S., RAPPUOLI, R., BLACK, S. **Prevention and control of meningococcal outbreaks: The emerging role of serogroup B meningococcal vaccines.** *Vaccine*, v. 33, p. 3628–3635, 2015.

PANDEY, J.P.; ZOLLINGER, W.D.; FUDENBERG, H.H.; LOADHOLT, C.B. **Immunoglobulin allotypes and immune response to meningococcal group B polysaccharide.** *J Clin Invest.*, v. 68, p. 1378-1380, 1981.

PEETERS, C.C.A.M., TENBERGEN-MEEKES, A.-M.J., POOLMAN, J.T., ZEGERS, B.J.M. & RIJKERS, G.T. **Immunogenicity of a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide.** *Vaccine*, v. 10, p. 833-840, 1992.

PELTOLA, H. **Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates.** *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 13, p. 302-317, 2000.

PIZZA, M., RAPPUOLI, R. ***Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity.** *Curr Opin Microbiol.*, v. 23, p. 68-72, 2015 Feb. Epub 2014 Nov.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M.M.; ARICÒ, B.; COMANDUCCI, M.; JENNINGS, G.T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C.L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D.W.; JEFFRIES, A.C.; SAUNDERS, N.J.; GRANOFF, D.M.; VENTER, J.C.; MOXON, E.R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI R. **Identification of vaccine candidate against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing.** *Science*; v. 287(5459), p. 1816-1820, 2000.

POLLARD, A. J., PERRETT, K. P., BEVERLEY, P. C. **Maintaining protection against invasive bacteria with protein– polysaccharide conjugate vaccines.** *Nature reviews.* v. 9, p. 213-220, 2009.

POLLARD, A.J. & FRASCH, C.E. **Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*.** *Vaccine*, v. 19, p. 1327-1246, 2001.

POOLMAN, J.T. **Development of a meningococcal vaccine.** *Infect. Agents Dis.* v. 4, p. 13-28, 1995(b).

POOLMAN, J.T.; VAN DER LEY, P.A.; TOMMASSEN, J. **Surface structures and secreted products of meningococci in: Meningococcal Disease** edited by Keith Cartwright, copyright by John Wiley & Sons, 1995(a) Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England.

PRESTON, A., MANDRELL, R.E., GIBSON, B.W.; APICELLA, M.A. **The lipopolysaccharides of pathogenic Gram-negative bacteria.** *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 22, p. 139-180, 1996.

PROFT, T., BAKER, E.N. **Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease.** Cell Mol Life Sci., v. 66, n. 4, p. 613-35, 2009.

RAPPUOLI, R. **Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis.** Vaccine, v. 19, p. 2319-2322, 2001.

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

RAPPUOLI, R.; BLACK, S.; LAMBERT, P.H. **Vaccine discovery and translation of new vaccine technology.** The Lancet, v. 378, n. 9788, p. 360-368, 2011.

REED, L.J. & MUENCH, H.A. **Simple method of determining fifty percent endpoints.** Am. J. Hig., v. 27, p. 494-497, 1938.

RICHMOND, P.; BORROW, R.; MILLER, E.; CLARK, S. **Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes memory.** J. Infect. Dis., v. 179, p. 569-572, 1999.

RICHMOND, P.; KACZMARSKI, E.; BORROW, R.; FINDLOW, J.; CLARK, S. **Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine.** J. Infect. Dis., v. 181, p. 761-764, 2000.

RODERICK, M. & FINN, A. **Advances towards the prevention of meningococcal B disease: a multidimensional story.** J Infect., v. 68, n. Suppl 1, p. 76-82, Jan 2014.

RODRIGUES, F.S. **Estudo de otimização dos processos de conjugação e controle do polissacarídeo de *N. meningitidis* grupo C à anatoxina tetânica.** (Tese) Mestrado Profissional de Tecnologia de Imunobiológicos, Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, 2009.

ROMEU, B.; LASTRE, M.; GARCÍA, L.; CEDRÉ, B.; MANDARIOTE, A.; FARIÑAS, M.; OLIVA, R.; ROSENQVIST, E.; PÉREZ, O. **Combined meningococcal serogroup A and W135 outer-membrane vesicles activate cell-mediated immunity and long-term memory responses against non-covalent capsular polysaccharide A.** Immunol Res., v. 58, n. 1, p 75-85, Jan 2014.

ROSENQVIST, E.; HØIBY, E.A.; BJUNE, G.; AASE, A.; HALSTENSEN, A.; LEHMANN, A.K.; PAULSSEN, J.; HOLST, J.; MICHAELSEN, T.E.; NØKLEBY, H.; FRØHOLM, L.O.; CLOSS, O. **Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine.** Dev Biol Stand., v. 92, p. 323-33, 1998.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E.A.; BJUNE, G.; BRYN, K.; CLOSS, O.; FEIRING, B.; KLEM, A.; NØKLEBY, H.; FRØLM, L.O. **Human antibody responses after vaccination with the Norwegian group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine: results from ELISA studies.** NIPH Ann., v. 14, p.169–179, 1991.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E.A.; WEDGE, E.; BRYN, K.; KOLBERG, J.; KLEM, A. **Human antibody response to meningococcal outer membrane antigens after three doses of Norwegian group B meningococcal vaccine.** *Infect. Immun.*, v. 63, p. 4642-4652, 1995.

ROSENQVIST, E.; KÄYHTY, H.; POLLARD, A.J. **Methods in molecular medicine, vol. 66: Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols** Edited by: A. J. Pollard and M. C. J. Maiden. Capítulo 18, 255-273. © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001.

ROSS, S.C. & DENSEN, P. **Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency.** *Medicine (Baltimore)*, v. 63, p. 243-273, 1984.

ROUPHAEL, N. G. & STEPHENS, D.S. ***Neisseria meningitidis: Biology, Microbiology, and Epidemiology.*** *Methods Mol Biol.*, v.799, p. 1–20, 2012.

RUIJNE, N.; LEA, R.A.; O'HALLAHAN, J.; OSTER, P.; MARTIN, D. **Understanding the immune responses to the meningococcal strain specific vaccine MeNZB measured in studies of infants.** *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 13, n. 7, p. 797–801, 2006.

RÜTTIMANN, R.W.; GENTILE, A.; PARRA, M. M.; SAEZ-LLORENS, X.; SAFADI, M. A.P.; SANTOLAYA, M.E. **A Consensus statement: meningococcal disease among infants, children and adolescents in Latin America.** *Pediatric Infectious Disease Journal*: - v. 33, n. 3, p. 284–290, March 2014.

SACCHI, C.T. **Caracterização genética e padronização do sistema de classificações das proteínas de membrana externa PorA.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2000.

SADARANGANI, M. & POLLARD, A.J. **Serogroup B meningococcal vaccines—an unfinished story.** *Lancet Infect Dis.*, v. 10, p. 112–124, 2010.

SÁFADI, M.A. & MCINTOSH, E.D. **Epidemiology and prevention of meningococcal disease: a critical appraisal of vaccine policies.** *Expert Review of Vaccines*, v. 10, n. 12, 2011.

SÁFADI, M.A.; BEREZIN, E.N.; OSELKA, G.W. **A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines.** *J Pediatr.*, v. 88, n. 3, p. 195-202, 2012.

SÁFADI, M.A.P. & BARROS, A.P. **Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações.** *J. Pediatr.*, v.82, n.3, p.s34-s35, 2006.

SÁFADI, M.A.P. & CINTRA, O. **Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention.** *Neurol Res.*, v.32, p. 263–71, 2010.

SÁFADI, M.A.P.; GONZÁLEZ-AYALA, S.; JÄKEL, A.; WIEFFER, H.; MORENO, C.; VYSE, A. **The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945-2010: an unpredictable and changing landscape.** *Epidemiol Infect.*, v.141, n.3, p.447-58, 2013.

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

SEGAL, S. & POLLARD, A.J. **Vaccines against bacterial meningitis.** *Brit Med Bull.*, v.72, n.1, p.65-81, 2005.

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

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

SIFONTES, S., INFANTE, J.F., PEREZ, P., CARO, E., SIERRA, G. & CAMPA, C. **The hyperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA-MENGOC-BC against *Neisseria meningitidis* B clinical isolates.** *Arch. Med. Res.*, v. 28, p. 41-45, 1997.

SILVEIRA, I.A.F.B.; BASTOS, R.C.; NETO, M.S.; LARANJEIRA, A.P.; ASSIS, E.F.; LEAL, M.L.; SILVA, W.C.; PERALTA, J.M.; JESSOUROUN, E. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid.** *Vaccine*, v. 25, p. 7261-7270, 2007.

SILVEIRA, IAFB. **Obtenção, caracterização físico-química e avaliação imunológica de vacinas conjugadas de polissacarídeo meningocócico sorogrupo C com toxoide tetânico.** Tese (Doutorado em Imunologia), Instituto de Microbiologia / IMPPG, UFRJ, Rio de Janeiro 2007.

STEEGHS, L.; KUIPERS, B.; HAMSTRA, H.J.; KERSTEN, G.; VAN ALPHEN, L.; VAN DER LEY, P. **Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response.** *Infect. Immun.*, v. 67, n. 10, p.4988–4993, 1999.

STEPHENS, D. S. **Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*.** *Vaccine*, v. 27, n. 2, p. B71-B77, 2009.

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

STEVEN, N. & WOOD, M. **The clinical spectrum of meningococcal disease.** In: **Meningococcal Disease** edited by Keith Cartwright, copyright by John Wiley & Sons, 1995; Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England.

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

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

TANIZAKI, M.M.; FUKASAWA, L.O.; DIAS, W.O.; SCHENKMAN, R.P.; RAW, I. **Adjuvant can improve protection induced by OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroups B/C in neonatal mice.** *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 41, n. 3, p. 205-10, Jul 2004.

TETTELIN, H.; SAUNDERS, J.N.; HEIDELBERG, J.; JEFFRIES, A.C.; NELSON, K.E. **Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58.** *Science*; v. 287, p.1809-1915, 2000.

TINSLEY C, NASSIF X. **Invasion of the central nervous system by *Neisseria meningitidis*.** *Methods Mol Med.*, v.67, p.635-47. 2001.

TRAORÉ, Y., NJANPOP-LAFOURCADE, B.M., ADJOGBLE, K.L., LOURD, M., YARO, S., NACRO, B., DRABO, A., PARENT, D.U., CHÂTELET, I., MUELLER, J. E., TAHA, M.K., BORROW, R., NICOLAS, P., ALONSO, J.M., GESSNER, B.D. **The rise and fall of epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup W135 meningitis in Burkina Faso, 2002-2005.** *Clin Infect Dis.*, v. 43, n. 7, p. 817-22, 2006, Epub 22 Aug 2006.

TAI, C.M.; FRASCH, C.E.; RIVERA, E.; HOCHSTEIN, H.D. **Measurement of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparation for vaccine usage.** *J. Biol. Stand.*, v. 17, p. 249-58, 1989.

TAI, J.; DYER, D.W.; SPARLING, F. **Loss of transferrin receptor activity in *Neisseriameningitidis* correlates with inability to use transferrin as iron source.** *Infect. Immun.*, v. 56, p. 3132-3138, 1988.

TUNHEIM, G., ARNEMO, M., NÆSS, L.M., FJELDHEIM, Å.K., NOME, L., BOLSTAD, K., AASE, A., MANDIAROTE, A., GONZÁLEZ, H., GONZÁLEZ, D., GARCÍA, L., CARDOSO, D., NORHEIM, G., ROSENQVIST E. **Preclinical immunogenicity and functional activity studies of an A+W meningococcal outer membrane vesicle (OMV) vaccine and comparisons with existing meningococcal conjugate- and polysaccharide vaccines.** *Vaccine.*; v. 31, n. 51, p. 6097-106, 2013 Dec 9, Epub 2013 Oct 10.

URIA, M.J.; ZHANG, Q.; LI, Y.; CHAN, A.; EXLEY, R.M.; GOLLAN, B.; CHAN, H.; FEATHERS, I.; YARWOOD, A.; ABAD, R.; BORROW, R.; FLECK, R.A.; MULLOY, B.; VAZQUEZ, J.A.; TANG, C.M. **A generic mechanism in *Neisseria meningitidis* for enhanced resistance against bactericidal antibodies.** *J Exp Med.*, v. 205, n. 6, p. 1423-34, Jun 2008.

VEDROS, N.A. Genus 1 *Neisseria*. In: Krieg, NR (Ed) Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 290-29, 1984.

VERHEUL, A.F.M.; SNIPPE, H.; POOLMAN, J.T. **Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component.** Microbiol. Rev., v. 57, n.1, p. 34-49, 1993.

VERMONT, C. & VAN DEN DOBBELSTEEN, G. ***Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection.** FEMS Immunol. Med. Microbiol., v.34, p. 89-96, 2002.

WEDEGE, E.; HØIBY, E.A.; ROSENQVIST, E.; FRØHOLM, L.O. **Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA.** J Med Microbiol., v. 31, n.3, p. 195-201, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine.** Technical report series, No. 658. Geneva: World Health Organization:29, 1981.

_____. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. WHO Technical report series No. 800. Geneva: World Health Organization, 1990.

_____. Headquarters, Pan american Bureau. Standardization and control of protein-based vaccines against serogroup B meningococcal disease (Draft), Petrópolis, Brazil, 11-12, 2000.

_____. Recommendations for the production and control of meningococcal group C conjugate vaccines. WHO Technical Report, Series 924, 2004.

YANG, Q., JENNINGS, H. **Methods in molecular medicine, vol. 66: Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols** Edited by: A. J. Pollard and M. C. J. Maiden. Cap. 6, pág. 41-47. © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001.

ZOLLINGER, W.D., MANDRELL, R.E. **Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide.** Infect Immun., v. 40, n. 1, p. 257-64, 1983.

ZOLLINGER, W.D.; MANDRELL, R.E.; ALTIERI, P.; BERMAN, S.; LOWENTHAL, J.; ARTENSTEIN, M.S. **Safety and immunogenicity of a meningococcal type 2 protein vaccine in animals and human volunteers.** J. Infect Dis., v. 137, p. 728-739, 1978.

ZOLLINGER, W.D.; KASPER, D.L.; VETRI, B.J.; ARTENSTEIN, M.S. **Isolation and characterization of a native cell wall complex from *Neisseria meningitidis*.** Infect. Immun., v. 6, p. 835-851, 1972.

ZUGHAIER, S.M.; LINDNER, B.; HOWE, J.; GARIDEL, P.; KOCH, M.H.; BRANDENBURG, K.; STEPHENS, D.S. **Physicochemical characterization**

and biological activity of lipooligosaccharides and lipid A from *Neisseria meningitidis*. J Endotoxin Res., v. 13, n.6, p. 343-57, 2007.

ZUGHAIER, S.M.; TZENG, Y.L.; ZIMMER, S.M.; DATTA, A.; CARLSON, R.W.; STEPHENS, D.S. ***Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure dependente activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway.** Infect Immun., v. 72, p. 371–380, 2004.