



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Felipe Jardim Sampaio

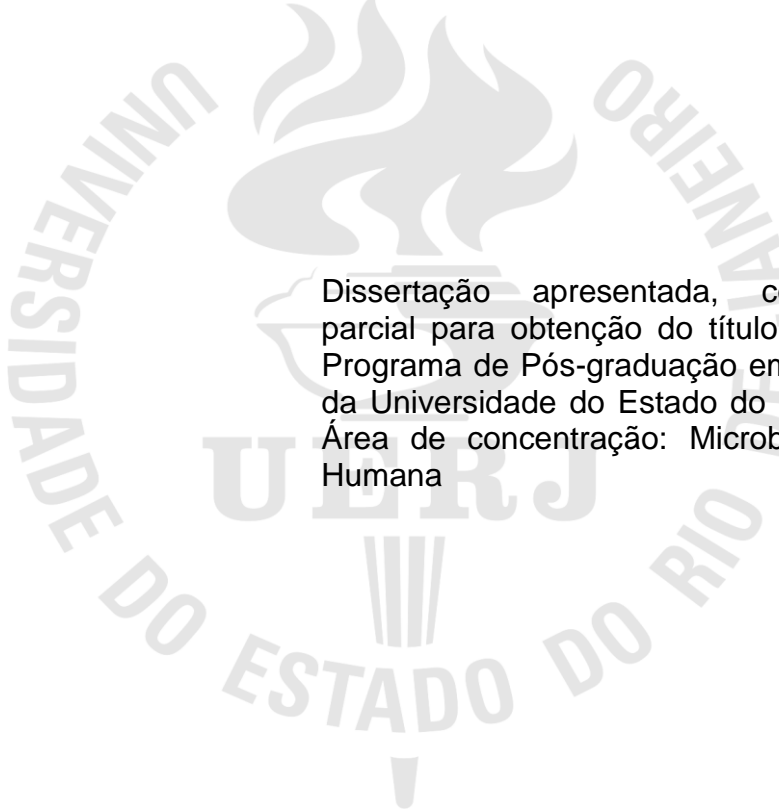
**Análise de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis*
sorogrupos B e C em indivíduos saudáveis**

Rio de Janeiro

2011

Felipe Jardim Sampaio

Análise de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em indivíduos saudáveis



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucimar Gonçalves Milagres

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S192 Sampaio, Felipe Jardim.
Análise de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis*
sorogrupos B e C em indivíduos saudáveis / Felipe Jardim Sampaio. –
2011.
63 f.

Orientadora: Lucimar Gonçalves Milagres

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Estado
do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Neisseria meningitidis* - Teses. 2. Meningite - Teses. 3.
Anticorpos bacterianos. 4. Infecções Meningocócicas. I. Milagres,
Lucimar Gonçalves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8.095.21

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Felipe Jardim Sampaio

Análise de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em indivíduos saudáveis

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 30 de agosto de 2011.

Orientadora: Prof^a Dra. Lucimar Gonçalves Milagres
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Alexandre de Souza Dias Vieira
Fundação Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2011

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial, minha mãe e meu irmão pela força e amor tão dedicados a mim. À minha orientadora pelos ensinamentos e verdadeiras orientações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que todos os dias prova a mim que confiando n'Ele tudo é possível.

A minha mãe, que lutou tanto quanto eu para que esta dissertação fosse construída

Ao meu irmão, pela amizade sincera.

A minha família, em especial minha madrinha Dolores e meus primos Rogério, João Carlos e Fernando, pela presença incondicional nos momentos em que mais precisei.

Aos amigos da família Pestana, em especial a Duane Godinho, pelos momentos de paciência e força dedicados a mim na construção deste trabalho.

A professora Lucimar Milagres pela orientação e paciência para que esta dissertação ficasse pronta.

A equipe do laboratório 5: Simone e Aline, sem as quais esta dissertação não seria feita. Obrigado por tudo, divido este momento com vocês.

Agradecimento especial a Gisele por ter finalizado os bactericidas, o que foi de vital importância na construção deste dissertação.

A todos do corpo docente e técnico do Departamento de Microbiologia , Imunologia e Parasitologia, pela amizade e momentos compartilhados.

A todos os amigos da turma de Ciências Biológicas UERJ 2005-1 pela amizade de tantos anos e incentivo constante. Também veteranos e calouros.

Às bibliotecárias Heloísa De Castro e Thais Vieira pela solicitude e prestabilidade no atendimento.

À equipe da Prof^a Ana Luiza Mattos-Guaraldi, junto com Prof Paulo Damasco, pela provisão dos soros utilizados nesta dissertação.

A Prof. Angela Correa de Freitas Almeida pela gentileza de ter revisado esta dissertação.

À equipe docente e pedagógica da Escola Municipal Prof^a. Silvia de Araujo Toledo, pela enorme compreensão e amizade nestes 6 meses de convivência.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram para que este trabalho fosse realizado.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e SR-2/UERJ, pela ajuda de custo nesta dissertação.

Como são agradáveis as suas obras! E, todavia, delas não podemos ver mais que
uma centelha.

Eclesiástico 42, 23

RESUMO

JARDIM, Felipe Sampaio. **Avaliação de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em indivíduos saudáveis**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Neisseria meningitidis é uma das principais causas de meningite bacteriana e septicemia em todo o mundo, acometendo principalmente crianças menores que 4 anos. No entanto, a infecção geralmente é assintomática em 10% a 35% da população, sendo estes indivíduos chamados de portadores. Os anticorpos líticos anti-meningococo estão correlacionados com proteção à DM. Assim, a geração e persistência de anticorpos líticos ou bactericidas têm sido frequentemente avaliadas após a vacinação. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil sorológico de um grupo de doadores de sangue em relação à imunidade natural ao meningococo. Avaliamos a presença de anticorpos bactericidas contra MenB ou MenC e cepas mutantes de MenB que não expressavam PorA ou Opa, proteínas de membrana externa. A especificidade de IgG em soros com títulos positivos de anticorpos bactericidas foi avaliada pelo *Western blot*. O grupo amostral foi composto em sua maioria por indivíduos, do sexo masculino, indivíduos não fumantes, de idade de 18 a 56 anos. Cerca de 26% e 25% dos indivíduos possuíam títulos de anticorpos $\geq 1:4$ contra MenB e MenC, respectivamente. Indivíduos fumantes apresentaram títulos de anticorpos bactericidas ligeiramente maiores contra MenC em comparação com MenB. Em relação à idade, percebeu-se que o grupo de 31 a 56 anos possuía títulos de anticorpos líticos maiores que o grupo de idade inferior, porém, sem significância estatística. A proteína PorA, mas não Opa, foi um importante alvo dos anticorpos bactericidas. No entanto, as reações de Western-blot não demonstraram correlações entre o reconhecimento de PorA ou outra proteína conhecida com os títulos de anticorpos bactericidas. Concluindo, a amostragem utilizada sugere que um percentual elevado da população adulta do Rio de Janeiro está protegida contra a doença e PorA representa um importante alvo dos anticorpos protetores.

Palavras-chave: *N. meningitidis* B. Portadores. Doença meningocócica. Proteínas de membrana externa. Anticorpo bactericida.

ABSTRACT

JARDIM, Felipe Sampaio. **Avaliação de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos B e C em indivíduos saudáveis**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Neisseria meningitidis is one of the leading causes of bactericidal meningitis and septicemia worldwide, particularly in children less than four years old. However, infection is usually asymptomatic in 10 – 35% in population, a phenomenon known as carriage. Bactericidal antibodies (SBA) are correlated to protection to meningococcal disease (DM), so that the presence of these antibodies are frequently evaluated after vaccination. The aim of this study was evaluate the serologic profile of a group of blood donors of Rio de Janeiro. We evaluated the presence of SBA against serogroup B (MenB) and C (MenC) meningococci and mutants strains of MenB that do not express PorA or Opa, outer membrane proteins. The specificity of IgG in serum with positive titlers of bactericidal antibodies was evaluated by *western blot*. The blood donors participants in this study was mainly men, no smokers, with age range 18 to 56 years old. About 26% and 25% of individuals had titlers of antibodies ≥ 4 , respectively, to MenB e MenC. Smokers showed higher titlers of bactericidal antibodies against MenC than MenB. Group of blood donors range 36 to 56 years old had higher titlers than the group range 18 to 30 years old, however, without statistic significance. The proteins PorA, but not Opa, was a important target of bactericidal antibodies. However, the *western blot* do not demonstrate correlation between the PorA recognition and SBA. Together, this results suggest that there is a high protection in adult population of Rio de Janeiro against DM and PorA represents a important target to protectors antibodies.

Keywords: *Neisseria meningitidis*. Inate immunity. Bactericidal antibody. Carriage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Títulos de anticorpos bactericidas contra cepas MenB (n = 60) e MenC (n = 64) nos soros de pacientes do banco de sangue.....	43
Figura 2 -	Títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa Cu385 (n =19) e H355 (n =19) em soros de doadores de banco de sangue.....	44
Figura 3 -	Títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa H355 e suas respectivas mutantes H355 PorA ⁻ e H355 Opa ⁻ em soros de doadores de banco de sangue.....	45
Figura 4 -	Perfil de proteínas presentes nas OMVs.....	46
Figura 5 -	Reatividade de IgG (Western-blot) de soros de doadores com diferentes títulos de anticorpos bactericidas contra OMPs da cepa Cu385.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características gerais dos doadores de sangue.....	37
Tabela 2 -	Características da amostragem de fumantes e não fumantes.....	39
Tabela 3 -	Distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas anti-MenB (cepa Cu385) e anti-MenC (cepa N79/96) por idade.....	41
Tabela 4 -	Perfil do nível de imunidade dos soros testados quanto a presença de anticorpos bactericidas contras as cepas MenB e MenC de <i>N. meningitidis</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

App	Proteínas de adesão e invasão
CEACAM	Moléculas de adesão celular carcinoembriônicas
DM	Doença Meningocócica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
KDO	2-ceto-3-desoxi-D-octano
Ig	Imunoglobulina
LNT	Lacto- <i>N</i> -neotetraose
LOS	Lipooligossacarideo
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
MenB	<i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo B
MenC	<i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo C
NadA	Adesina A de <i>Neisseria</i>
OMP	Proteínas de membrana exaterna
OMV	Vesícula de Membrana Interna

SUMÁRIO

	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1	<i>N. meningitidis</i>: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO.....	14
1.1	Cápsula.....	14
1.2	Proteínas de Membrana Externa (OMPs).....	15
1.3	Lipooligossacarídeos(LOS).....	16
2	PORTADORES E DOENÇA MENINGOCÓCICA.....	17
3	EPIDEMIOLOGIA.....	21
4	TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE.....	23
5	PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	25
5.1	VACINAS.....	25
6	Resposta imunológica ao meningococo.....	28
7	OBJETIVOS.....	30
7.1	Objetivo geral.....	30
7.2	Objetivos específicos.....	30
8	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
8.1	Cepas de <i>n. meningitidis</i>.....	31
8.2	Soros de doadores do banco de sangue.....	31
8.3	Cultivo da bactéria.....	31
8.4	Ensaio bactericida.....	32
8.5	Extração das vesículas da membrana externa (OMVs) de MenB.....	32
8.6	SDS-PAGE E análise do perfil das proteínas da membrana externa (oMPs).....	33
8.7	<i>Western Blotting</i>	34
8.8	Análise estatística.....	35
9	RESULTADOS.....	36
9.1	Características gerais da amostragem.....	36
9.1.1	<u>Perfil de fumantes e não fumantes entre os doadores do banco de sangue.....</u>	38
9.1.2	<u>Distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas por idade dos doadores do banco de sangue.....</u>	40
9.2	Análise do perfil sorológico dos indivíduos testados.....	42

9.2.1	<u>O nível de imunidade dos soros testados</u>	42
9.2.2	<u>Avaliação do perfil sorológico dos doadores frente a diferentes cepas de MenB e suas variantes</u>	44
9.2.3	<u>Avaliação da reatividade de IgG nos soros dos doadores do banco de sangue com OMPs de MenB</u>	46
9.3	Prevalência dos sorogrupos B e C no Rio de Janeiro antes e após a coleta dos soros	47
10	DISCUSSÃO	50
	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neisseria meningitidis é um patógeno exclusivamente humano que pode causar meningite e septicemia com taxa de letalidade de cerca de 10% (Schneider *et al.*, 2007; Waterbeemd *et al.*, 2010). Tais dados se agravam quando comparamos a incidência de pessoas acometidas em relação à idade: crianças menores que 2 anos de idade são particularmente mais suscetíveis a essa bactéria, provavelmente por não conseguirem elaborar uma resposta imunológica eficaz contra este patógeno.

N. meningitidis tem como hospedeiro natural os seres humanos, sendo parte da flora normal da nasofaringe, funcionando assim como um reservatório. A infecção geralmente é assintomática em 10% a 35% da população, sendo estes chamados de portadores (Horton *et al.*, 2005). Raramente a bactéria consegue acessar a corrente sanguínea, onde se multiplica e se espalha para outros sítios, especialmente o líquido cérebro-espinhal, produzindo a meningite bacteriana (Yazdankhah & Caugant, 2004).

A doença meningocócica (DM) continua, ainda nos dias de hoje, a ser um importante problema de saúde pública no mundo (Petola, 1984; Caugant & Maiden, 2009). Quatro sorogrupos (B, C, Y e W135) de *N. meningitidis* são responsáveis pelos principais surtos de DM. Várias vacinas, como as baseadas na cápsula polissacarídica, se mostraram eficazes no combate a esta doença. Porém, isto não é válido para todos os sorogrupos. O principal desafio ainda é o combate ao meningococo B (Men B) para o qual ainda não há vacinas eficazes. As que já existem são baseadas em antígenos subcapsulares na forma de vesículas de membrana externa (OMVs) ou proteínas recombinantes (Jodar *et al.*, 2002).

A explicação para a ineficácia na construção de vacinas polissacarídicas contra Men B está na constituição de sua cápsula. Além de ser pouco imunogênica devido a sua constituição química ela se mostra um importante fator de sobrevivência para o meningococo, já que se relaciona ao escape do sistema imunológico (Findlow *et al.*, 2007).

No final da década de 60, Goldshneider *et al.* (1969), demonstraram, pela primeira vez, a correlação entre a presença de anticorpos bactericidas para o meningococo e a proteção contra a D.M. Além disso, observou-se que, ao contrário

de adultos, crianças menores que dois anos não possuíam atividade bactericida em seus soros contra cepas patogênicas de *N. meningitidis*. Desta forma, o ensaio bactericida foi recomendado em 1976 pela Organização Mundial da Saúde como o teste ouro para a avaliação da imunogenicidade de vacinas polissacarídicas (Borrow *et al.*, 2005).

1 *N. MENINGITIDIS*: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO

N. meningitidis é um diplococo gram-negativo, sendo geralmente não esporulado, imóvel e podendo conter ou não cápsula e pili. Entre as principais estruturas com importância na virulência, antigenicidade e imunogenicidade destacam-se a cápsula, proteínas da membrana externa (OMPs) e o lipooligosacárido (LOS). (Bovre 2004)

1.1 Cápsula

Cepas de *N. meningitidis* virulentas possuem uma cápsula polissarídica, a qual permite ao organismo causar doenças invasivas, tais como bacteriemia e meningite. Cepas não encapsuladas que são frequentemente encontradas na nasofaringe, raramente causam infecção. (Harrion, 2010).

A cápsula é a base para a classificação da bactéria em sorogrupo. Dos 13 diferentes tipos de cápsulas polissarídicas (A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z, Z' e M), somente seis frequentemente causam doenças: A, B, C, W-135, X e Y (Rosenstein *et al.*, 2003; Girard *et al.*, 2006).

O sorogrupo A é o principal responsável por epidemias na África Subsaariana, no chamado “meningitis belt”. Também, foi responsável por surtos nas décadas de 20 e 40 no Brasil (Harrison *et al.*, 2009). O sorogrupo A é composto por N-acetil-D-manosamina-6-fosfato e N-acetilglucosamina-1-fosfato. Já os sorogrupos B, C, W-135 e Y possuem cápsulas que são compostas por ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico). O sorogrupo B possui um tipo único, ácido poli α -2,8-N-acetilneuramínico que é estrutural e antigenicamente idêntico aos glicopeptídios da molécula de adesão celular do sistema nervoso de fetos humanos e aos tecidos neurais e extra-neurais de adultos (Finne *et al.*, 1983). O meningococo possui a capacidade de modular seu fenótipo capsular através de recombinação genética. Tal fato permite à bactéria realizar variação de fase e antigênica o que lhe garante um importante atributo de virulência.

1.2 Proteínas de Membrana Externa (OMPs)

Várias OMPs são úteis para a caracterização de cepas de meningococo. A baixa atividade de anticorpos líticos que reconhecem estas proteínas determinam a susceptibilidade a infecção por *N. meningitidis*. As OMPs podem ser caracterizadas através do seu peso molecular após corrida em gel de eletroforese (SDS-PAGE), em cinco classes estruturais: Classe 1 ou PorA (45-47 Kd), classe 2 (40-42 Kd) ou 3 (37-39 Kd), são denominadas de PorB, classe 4 (32-34 Kd) ou RmpM (*Reduction modifiable Protein*) e classe 5 (26-29 Kd) ou Opa (Fasch *et al.*, 1987).

PorA e PorB funcionam como porinas com seletividade, respectivamente, para cátions e ânions. (Tommassen *et al.*, 1990). Todos os meningococos expressam PorB e a maioria das cepas expressa PorA (Tsai *et al.*, 1981). As diferenças imunológicas encontradas em PorB e PorA são a base para uma classificação do micro-organismo em sorotipos e sorosubtipos, respectivamente (Frasch *et al.*, 1987).

PorA foi identificada como o principal antígeno capaz de induzir anticorpos bactericidas após vacinação contra MenB (Milagres *et al.*, 1998; Wedege *et al.*, 1998), porém, apresenta variação antigênica importante entre as cepas circulantes, principalmente entre o sorogrupo B. Além disso, foi observado que algumas cepas não expressam o gene *porA* (Ende *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2006).

PorA possui duas regiões antigenicamente variáveis, VR1 e VR2 que exibem grande diversidade dentro da população, com 196 VR1 e 534 VR2 variações peptídicas descritas até o momento. (Filippis *et al.*, 2007). Estas VRs são os epítomos reconhecidos por anticorpos monoclonais no sistema de tipagem.

A OMP de classe 4, também conhecida como RmpM é expressa constitutivamente na membrana externa do meningococo. Esta proteína é antigenicamente invariável sendo sua função ainda desconhecida na patogênese ou fisiologia do micro-organismo (Rosenqvist *et al.*, 1999).

O meningococo também expressa proteínas de classe 5 codificadas por 4 *loci* (*opaA*, *opaB*, *opaD*, e *opaJ*), genericamente chamadas de Opa (opacity-associated proteins). Estas proteínas são adesinas que exercem um importante papel nas interações com a mucosa epitelial e endotelial, permitindo que o patógeno fique aderido à mucosa e, por conseguinte, seja capaz de invadir e alcançar a corrente

sanguínea. Esses efeitos são mediados por interações com membros das moléculas de adesão celular carcinoembriônicas (CEACAM) (Callaghan *et al.*, 2006).

1.3 Lipo-oligossacarídeos (LOS)

N. meningitidis, assim como outras bactérias Gram-negativas, possui uma endotoxina localizada em sua membrana externa denominada LPS. Ao contrário de bactérias entéricas, o LPS do meningococo não apresenta cadeias repetitivas do antígeno O, sendo então conhecido como lipo-oligossacarídeo (LOS) (Yazdankhah & Caugant, 2004). Tal LOS mantém o core conservado composto por heptose fosfato e 2-ceto-3-desoxi-D-octonato (KDO), ligados ao lipídio A. Em *N.meningitidis* LOS contém duas cadeias polissacarídicas α e β . A primeira tem se mostrado mais importante, visto conter Lacto-*N*-neotetraose (LNT) a qual é idêntica a um antígeno humano.

2 PORTADORES E DOENÇA MENINGOCÓCICA

A infecção assintomática (estado de portador) por *N. meningitidis* incide em cerca de 10 a 35% da população adulta (Siamak & Caugant, 2004). Por ser parte da flora normal da nasofaringe, esse sítio funciona como um reservatório, funcionando também como sítio de transmissão da bactéria. (Schneider *et al.*, 2007). A relação entre portadores e a progressão para a doença invasiva não é completamente entendida (Sim *et al.*, 2000; Caugant & Maiden, 2009).

O atual entendimento da epidemiologia do estado de portador de *N. meningitidis* é baseado principalmente em amostras recolhidas por *swabs* de nasofaringe. No entanto, um estudo recente mostrou que a taxa de portadores pode ser subestimada quando usa-se métodos convencionais, como *swab* nasofaríngeo. Por uso de imunohistoquímica, para detecção de *N. meningitidis* em pacientes submetidos à retirada de tonsilas, foi observado que o meningococo estava presente em 45% das amostras, enquanto que somente 10% foram positivas pela cultura de *swabs* de nasofaringe (Sim *et al.*, 2000; Siamak & Caugant, 2004). Assim, novos métodos como detecção por Real-time PCR estão sendo desenvolvidos. (Sacchi *et al.*, 2011).

O conhecimento sobre a duração do estado de portador é limitado já que muitos estudos são baseados somente em técnicas fenotípicas para a caracterização da cepa em questão, feito somente por um período determinado, não avaliando o aparecimento de outras possíveis cepas ao longo do estudo (Siamak & Caugant, 2004). No entanto, várias publicações demonstraram que a duração do estado de portador pode variar de 2 meses para mais de 9 meses (Gold *et al.*, 1978; Bencic *et al.*, 1991; AlaÁldeen *et al.*, 2000). De Wals *et al.* (1983) encontraram uma correlação entre o tempo de duração do estado de portador e sorogrupos: MenB, 16.2 meses e MenC, 18 meses. Em 2008, Glitza *et al.*, relataram que a duração do estado portador foi de 5.5 meses e de 2 meses em 22% e 33%, respectivamente, de adolescentes de 15 a 18 anos.

Apesar da alta incidência de portadores do meningococo, podendo chegar a 35% em adolescentes (Horton *et al.*, 2005; Caugant & Maiden, 2009), a DM é rara, com baixas taxas de incidência. Com exceção de indivíduos imunocomprometidos,

com deficiência em algum componente do sistema complemento, indivíduos imunocompetentes raramente apresentam a doença.

A idade é um dos mais importantes aspectos que influenciam nas taxas de indivíduos portadores. Outros fatores, tais como, gênero masculino, infecções coincidentes de origem viral e bacteriana, ser fumante ativo, baixo *status* sócio-econômico e frequentar locais confinados aumentam o risco de ser um portador do meningococo. (Welsh & Granoff, 2007).

A prevalência do estado de portador varia com a idade, sendo maior em adolescentes e menores em crianças (Trotter *et al.*, 2006). Foi mostrado que a taxa de portadores em crianças ≥ 4 anos de idade é menor que 3%, porém aumenta para 24 – 37% no grupo de 15 a 24 anos para então decair para menos que 10% nos grupos mais velhos. (Blackwell *et al.*, 1990; Caugant *et al.*, 1994). Horton *et al.* (2005) demonstraram que os níveis de IgA na saliva de voluntários aumentavam conforme a idade, sendo maior em indivíduos maiores de 18 anos. A taxa de portadores é maior no grupo de idade de 15 a 18 anos, grupo que apresenta alta incidência de DM. (Pollard, 2004). No entanto, outros fatores que não a idade, podem estar correlacionados, como hábitos tabagistas e entrada na universidade ou no serviço militar (Balmer *et al.* 2002; Kvalsvig *et al.*, 2003).

Desta forma, fatores de risco como ser ou não fumante foram alvos de estudos que tentaram mostrar a correlação do estado de portador e a prevalência da D.M. Observou-se que ser fumante, seja ativo ou passivo, é um fator de risco que aumenta a possibilidade de indivíduos se tornarem portadores do meningococo e desenvolverem a DM (Davies *et al.* 1996). Horton *et al.* (2005), demonstraram que os níveis de IgA na saliva de fumantes são maiores do que em não fumantes, o que indiretamente sugere que este grupo de indivíduos apresenta maior taxa de portadores. Porém, como citado acima, para fumantes passivos, a exposição indireta ao fumo, principalmente em crianças, pode estar também associada com o desenvolvimento de DM.

Grupos como militares e estudantes universitários estão sob outro fator de risco: a convivência em ambientes confinados e aumento da proximidade e contatos sociais que aumentam o risco de transmissão do meningococo e, por conseguinte, aumenta o risco de se tornar portador. Em estudo realizado na Noruega, a taxa de portador entre uma tropa de militares foi maior que 70% (Caugant *et al.* 1992). Um estudo de monitoramento realizado na Polônia na primavera e outono de 1998

mostrou que a taxa de portadores entre recrutas militares foi dinâmica, com taxas de portadores variando de 36 a 61% dentro de um período de 2 meses (Tyski *et al.*, 2001).

É percebido também que a taxa de portador de *N. meningitidis* aumenta rapidamente entre estudantes universitários no primeiro mês do ano acadêmico e muito deste crescimento acontece logo na primeira semana (Neal *et al.*, 2000). Um estudo prévio antes e durante um surto de meningococo C dentro de uma universidade, mostrou que, contra MenC, os anticorpos são direcionados contra a capsula polissacarídica, preferencialmente. No entanto, a presença de anticorpos bactericidas contra MenB correlacionou-se diretamente contra a porina PorA (Jordens *et al.*, 2004). Observa-se também que a prevalência de portadores de *N. meningitidis* é geralmente maior dentro de contatos domiciliares de pacientes acometidos pela doença do que na população em geral (Cardenosa *et al.*, 2001). Foi observado que 50% dos portadores que conviviam com indivíduos acometidos pela DM, apresentavam a mesma cepa destes pacientes (Yazdankhah & Caugant, 2004).

Para que se caracterize o estado de portador deve haver a colonização da nasofaringe. Esta pode ser feita por várias espécies, patogênicas ou não, que competem pelo sítio. Entre as não patogênicas a mais discutida é *Neisseria lactamica*, que tem sido relacionada ao desenvolvimento de imunidade natural idade-dependente contra *N. meningitidis*. Ela é prevalente na nasofaringe de crianças de 18 meses de idade chegando a mais de 40% no primeiro ano de vida (Cartwright *et al.*, 1987; Bennett *et al.*, 2005). Nestas idades é raro o isolamento de meningococo na nasofaringe (Evans *et al.*, 2010). No entanto, *N. lactamica* se torna menos freqüente com o aumento da idade e *N. meningitidis* torna-se prevalente. Corroborando esta idéia, Vaughan *et al.* (2008) observou que os títulos de anticorpos bactericidas contra o meningococo, bem como, de IgG aumentam.

Tal exposição a bactérias comensais ou não pode gerar reatividade cruzada, aumentando o nível de imunidade contra o meningococo durante a infância. (Troncoso *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2001). Desta forma, o estado de portador de meningococos comensais, especialmente *Neisseria lactamica*, é associado com altos títulos de anticorpos contra *N. meningitidis*, com a redução do estado de portador do meningococo em jovens e a reduzida freqüência de DM (Vaughan *et al.*, 2008). Isto se deve, em parte, a grande presença de estruturas homólogas nas duas

espécies tanto que, soro de camundongos imunizados com *N. lactamica* e posteriormente com *N. meningitidis* foi capaz de matar o meningococo (Troncoso *et al.*, 2000).

Em outro estudo, 61 estudantes que receberam doses intranasais de uma suspensão de *N. lactamica*, foram capazes de gerar IgA na saliva e IgG no soro contra este organismo. Além disso, a colonização induziu reação cruzada gerando anticorpos com atividade opsonofagocítica contra *N. meningitidis* (Evans *et al.*, 2010).

Neste contexto, *N. lactamica*, ao contrário de *N. meningitidis*, mantém uma relação comensal com o hospedeiro portador na ausência de resposta imune adaptativa. Isto pode prolongar o período de susceptibilidade a colonização por bactérias não patogênicas e patogênicas, como o meningococo (Vaughan *et al.*, 2008).

A ausência de cápsula em *N. lactamica* indica que OMPs e LOS são os principais antígenos indutores de imunidade cruzada. (Sanchez *et al.* 2002).

3 EPIDEMIOLOGIA

Uma importante característica do meningococo é sua epidemiologia variável. A incidência e ocorrência de surtos epidêmicos sofre flutuações cíclicas, além disso, a distribuição por sorogrupos no globo é altamente regional. Assim, podemos observar que os sorogrupos B, C e Y são muito comuns nas Américas. Na África, há o “cinturão de meningite”, no qual o sorogrupo A é bem comum, mas também há surtos de sorogrupos C, W-135 e X. Na Europa, os grupos B e C são os mais prevalentes. Na Ásia, A e C são os mais comuns. (Jodar *et al.*, 2002)

O Meningococo B é o primeiro motivo de preocupação em países industrializados, onde tem sido responsável por epidemias de DM (Stephens *et al.*, 2007).

Dentre as pessoas mais acometidas, há grupos de risco definidos como estudantes universitários no primeiro ano de faculdade que vivem em dormitórios, o consumo de álcool, o tabagismo e infecções respiratórias. Indivíduos com deficiência no sistema complemento e outras formas de imunossupressão têm um risco maior de incidência da DM.

A idade é um fator de risco de grande interesse no estudo da doença meningocócica. A incidência de DM é maior entre crianças menores que 2 anos de idade, adolescentes e idosos. Nos Estados Unidos cerca de metade dos casos de DM em crianças é causada por Men B e 75% da doença que ocorre em indivíduos maiores que 11 anos de idade são causadas pelos sorogrupos C, Y ou W-135 (Poland, 2010).

A maioria das informações sobre DM no Brasil vem de São Paulo e Rio de Janeiro. O Brasil tem, historicamente, problemas com o sorogrupo A com surtos epidêmicos registrados já nas décadas de 20 e 40 (Moraes *et al.*, 2005). Na década de 70, o Brasil teve a experiência de dois grandes surtos epidêmicos, um causado por sorogrupo C e outro por sorogrupo A, em 1971 e 1974, respectivamente. Na década de 90, o cenário foi praticamente dominado pelo sorogrupo B, sendo para isso, iniciada uma campanha de vacinação contra este sorogrupo nos anos subsequentes. (Moraes *et al.*, 1992).

Atualmente, a DM ocorre com incidências de 1 a 2 casos por 100.000 habitantes e a letalidade corresponde a 19,4% (SINAN/SVS/MS, 2005), onde o sorogrupo B é o

responsável por 30% dos casos de DM e o sorogrupo C induz 70% dos casos restantes que são notificados na maioria das regiões do país. (Brasil, 2009). Entre as cepas de menB prevalecem os fenótipos 4,7:P1.19,15 e 4,7P1.7,1. Entre as cepas de MenC prevalece nos últimos anos o fenótipo 23:P1.14-6. (Lemos *et. al.*, 2006)

4 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

A mucosa naso-orofaríngea é o único reservatório natural de *N. meningitidis*, cuja transmissão de pessoa a pessoa se dá através de contato direto ou através de perdigotos. A sobrevivência da bactéria no perdigoto parece estar associada às condições climatológicas, tais como temperatura e umidade (van Deuren *et al.*, 2000).

Para o meningococo colonizar a nasofaringe, ele deve aderir à superfície da mucosa, utilizar os nutrientes disponíveis no local e evadir do sistema imune do hospedeiro (Yazdankhah & Caugant, 2004).

Alguns fatores de sobrevivência do meningococo se dão através de modulação de antígenos de superfície que está diretamente ligado a transferência de genes alelos ou até mesmo fragmentos de genes adquiridos dentre moléculas DNA de outras cepas de *Neisseria* (Hill *et al.*, 2005). Entre os mais comuns está a variação de fase de genes ligados a síntese da cápsula polissacarídica (Segal *et al.*, 1986). Desta forma, a bactéria pode facilitar sua adesão à superfície da mucosa nasofaríngea quando desliga genes relacionados a síntese da cápsula, deixando de expressá-la. Isto é corroborado quando observamos que a maior prevalência entre portadores de *N. meningitidis* na nasofaringe se dá por cepas não capsuladas (Vaughan *et al.*, 2008). É descrito também que há troca de cápsula (por transferência gênica) entre cepas, como MenC e MenB. Isto pode estar relacionado a pressão seletiva que MenC recebe após repetidos programas de vacinação contra esta cepa (Stephens *et al.*, 2007).

Após modulação de cápsula, o pili tipo IV, responsável pelo contato inicial, adere à mucosa através do receptor CD46 (proteína co-fatora de membrana), que é expresso em todas as células humanas, exceto em eritrócitos. Além disso, está relacionado com a aquisição por bactérias de moléculas de DNA no meio. As proteínas associadas à opacidade (Opa e Opc) se ligam ao receptor CD66 e aos receptores proteoglicanos, respectivamente, levando ao rearranjo das moléculas de actina e, conseqüentemente, a mudanças na conformação do citoesqueleto (Gonzalez *et al.*, 2004). Outras várias novas adesinas têm sido descritas. Entre elas está NadA (adesina de *Neisseria A*) que interage com células epiteliais e se mostra importante na geração de imunidade, revelando-se uma proteína candidata na

constituição de vacinas (Capecchi *et al.*, 2005). Duas outras proteínas como NhhA e App (proteínas de adesão e invasão) podem contribuir como fatores de virulência a bactéria, sendo expressas em cepas patogênicas de *N. meningitidis* (Hill *et al.*, 2010).

Durante a invasão, diversos fatores bacterianos modulam o metabolismo das células da mucosa. A ligação do pili e das proteínas de opacidade aos seus receptores levam à transdução de sinais para a célula hospedeira. Além disso, o meningococo secreta IgA1 proteases responsáveis pela clivagem específica de IgA1. Através do estímulo da degradação de uma glicoproteína de membrana nos endossomos e lisossomos, as IgA1 proteases também promovem a sobrevivência da bactéria nas células epiteliais (van Deuren *et al.*, 2000).

A entrada do meningococo na corrente sangüínea é provavelmente mais freqüente do que clinicamente reconhecida, mas é usualmente temporária (Tzeng & Stephens, 2000). A sua sobrevivência e proliferação dependem, particularmente, de fatores de virulência ou de defeitos na resposta do hospedeiro. *N. meningitidis* possui um mecanismo de aquisição de ferro através de proteínas ligadoras de transferrinas. No entanto, o fator de virulência mais importante para a sobrevivência do meningococo no sangue é a cápsula polissacarídica, que protege contra a lise mediada pelo complemento e a fagocitose pelos neutrófilos (van Deuren *et al.*, 2000).

5 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

O tratamento de escolha da DM é a administração parenteral de antibióticos β -lactâmicos, tais como cefalosporinas e penicilinas, para os quais resistência é pouco reportada. (Findlow *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2010). A quimioprofilaxia limita surtos epidêmicos quando administrada rapidamente a contatos próximos

Medidas preventivas contra vários sorogrupos tem sido avaliadas por um período considerável na forma de vacinas baseadas em polissacarídeos, porém, apesar de estimular produção de anticorpos protetores, tal medida não gera memória imunológica de longo prazo (Voer *et al.*, 2010). Outras vacinas conjugadas com polissacarídeos ligados à proteínas carreadoras e baseadas em OMVs também são empregadas. Esta última principalmente no combate e prevenção de DM causada por Men B.

5.1 Vacinas

Goldschneider *et al.* (1969) destacaram o papel central dos anticorpos líticos anti-meningococo na proteção contra a DM. Consequentemente, a geração e persistência de anticorpos líticos ou bactericidas têm sido frequentemente avaliadas após a vacinação (Holst *et al.*, 2003; Gioia *et al.*, 2005; Feiring *et al.*, 2006). De tal importância, esta medida é usada para avaliar a efetividade de vacinas polissacarídicas e aconselhada pela Organização Mundial da Saúde.(Welsh & Granoff, 2007). Tendo isto como princípio, vacinas polissacarídicas como a monovalente (A ou C), a bivalente (A/C) e a tetravalente (A, C, Y e W-135) foram construídas. Estas estimulam uma resposta imune com produção de anticorpos específicos para os polissacarídeos incluídos na vacina. Apesar da alta soroconversão e eficácia, a resposta de anticorpos é curta e varia com a idade e com o polissacarídeo sorogrupo-específico contido na vacina (Pace & Pollard, 2007). Além disso, os polissacarídeos purificados demonstraram ser um fraco imunógeno em crianças menores de dois anos de idade, faixa etária de maior incidência da DM e a duração da imunidade induzida foi considerada limitada e idade-dependente

(Gold *et al.*, 1977), sem mencionar a necessidade de várias doses da vacina o que a torna inviável economicamente. Apesar das suas limitações, as vacinas polissacarídicas têm sido usadas exclusivamente no controle de epidemias nos países do “cinturão da meningite” na África (Stephens *et. al.*, 2007).

Tendo em vista tais fatos, estudos iniciaram a conjugação destes polissacarídeos com proteínas carreadoras, como o toxóide tetânico ou CRM₁₉₇ (um peptídeo mutante relacionado ao toxóide diftérico). Tais vacinas polissacarídicas conjugadas foram introduzidas no Reino Unido em 1999 e logo adotada em outros países da Europa, no Canadá e nos Estados Unidos. (Ramsay *et. al.*, 2003; Trotter *et al.*, 2004; Larrauri *et. al.*, 2005; Snape & Pollard, 2005; Trotter *et al.*, 2006) e se mostraram seguras e imunogênicas em crianças pequenas, induzindo memória imunológica e diminuindo o estado de portador, resultando, portanto, numa resposta timo-dependente, ao contrário das vacinas polissacarídicas que produzem respostas timo-independente. Assim, há a produção de anticorpos de alta afinidade e a geração de memória imunológica, como células B de memória específicas para os antígenos polissacarídicos. (Trotter *et al.*, 2004). No Brasil, segundo o programa nacional de imunizações do Ministério da Saúde, a vacina conjugada anti-MenC foi introduzida na rede pública a partir de 2010.

Contra Men B, não há uma vacina protetora universal. Men B possui um polissacarídeo capsular que é similar ao ácido siálico presente na membrana de células humanas. Portanto, vacinas polissacarídicas são ineficazes mesmo quando conjugadas a proteínas carreadoras. Esforços em construir uma vacina contra Men B têm focado em antígenos não capsulares, tais como os presentes nas vesículas de membrana externa (OMV) e LOS (Pizza *et al.*, 2000; Zimmer & Stephens, 2006).

A proteína PorA foi identificada como o principal alvo de anticorpos bactericidas induzidos por vacinas OMVs (Milagres *et al.*, 1998; Wedege *et al.*, 1998; Milagres *et al.*, 2000). Contudo, é altamente variável entre linhagens de Men B circulantes. Por essa razão, o “Netherlands Vaccine Institute” desenvolveu uma vacina hexavalente com OMVs baseada em cepas modificadas de *N. meningitidis* que expressavam múltiplos subtipos de PorA, incluindo um total de 6 subtipos de PorA, dos quais os subtipos incluídos na vacina foram: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c,10; P1.12,13; P1.7h4. Porém, alguns fenótipos foram mais imunogênicos que outros e a vacina não foi para os testes clínicos finais (Kleijn *et al.*, 2000).

Outras vacinas constituídas por OMV foram desenvolvidas com sucesso no controle de surtos da doença causada pelo meningococo B em Cuba (Sierra *et al.*, 1991) e Noruega (Bjune *et al.*, 1991). Porém não foram capazes de proteger crianças menores que 4 anos de idade quando administradas em duas doses (Jodar *et al.*, 2002). No Brasil, esta vacina, após imunização em massa de crianças de 3 meses a 6 anos de idade, mostrou eficácia de 74% para crianças acima de 4 anos, 47% para crianças de 2 a 4 anos, não havendo proteção para crianças menores que 2 anos. (Moraes *et al.*, 1992). Porém, vacinas compostas por OMVs da cepa prevalente continuam sendo a principal estratégia para conter epidemias contra MenB (Trotter *et al.*, 2007).

A partir disto, novas abordagens têm sido feitas já que o desenvolvimento de vacinas contra MenB continua sendo um desafio em todo o mundo. Com o seqüenciamento do genoma bacteriano, todas as proteínas codificadas por um micro-organismo tornaram-se disponíveis, possibilitando descobrir novos alvos para construção de vacinas. Tal método, possibilitou o surgimento da vacinologia reversa. (Mariel *et al.*, 2008). Em um estudo recente, feito em crianças, administrou-se uma vacina recombinante contra MenB utilizando-se três proteínas principais: adesina A de *Neisseria* (NadA), proteína ligadora de fator H (fHBP) e antígeno ligador de heparina (NHBA), formulados ou não com OMV. Os resultados mostraram que as vacinas foram imunogênicas contras cepas expressando NadA e fHBP homologas. Contudo, observou-se que a construção com OMVs foi mais eficaz, apresentando maior imunogenicidade (Findlow *et al.*, 2010).

6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO MENINGOCOCO

A proteção contra infecções causadas por *N. meningitidis* depende da imunidade inata, em particular, do funcionamento do sistema complemento. Além disso, a resposta imune humoral é essencial para a proteção contra a bactéria (Vermont & Dobbelsteen, 2002). A natureza precisa da imunidade natural ao meningococo continua desconhecida, embora haja uma interação complexa entre o micro-organismo e a barreira mucosa da nasofaringe, com a participação dos mecanismos da imunidade inata e imunidade adquirida. (Pollard. & Frasch, 2001).

Na imunidade inata, a medida de prevenção contra *N. meningitidis* caracteriza-se pela capacidade da bactéria de ativar o sistema complemento (Borrow *et al.*, 2005). Uma vez que o meningococo atravessa a barreira da mucosa da nasofaringe, neutrófilos são as primeiras células do sistema imune encontradas. Tais células contribuem para eliminação da bactéria em indivíduos durante a fase aguda de infecção quando a imunidade adaptativa ainda não tenha se estabelecido (Schmitt *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro*, indicavam que o LPS, que está associado ao choque séptico, parece ser um dos maiores estimulantes da liberação de citocinas inflamatórias durante o curso da infecção. (Moller *et al.*, 2005). Receptores do tipo *Toll-like* (TLR) foram descritos como um grupo de receptores do sistema imune inato que reconhece estruturas comuns a muitos diferentes patógenos e algumas moléculas endógenas. Um dos mais importantes é o TLR4 que faz a transdução de sinais de reconhecimento de moléculas de LPS presente em bactérias Gram-negativas (Ingalls *et al.*, 2000)

Dentre as porinas de *N. meningitidis* que estão presentes em OMV, a principal é a PorA. Ela é capaz de estimular a produção de altas quantidades de IgA específica na saliva de humanos (Horton *et al.*, 2005) Além disso, outros estudos demonstraram que PorA é uma proteína altamente imunogênica e induz a geração de anticorpos bactericidas sorosubtipos específicos em indivíduos adultos. (Pollard & Frasch, 2001). Em relação a MenB, estudos tem demonstrado uma associação entre atividade bactericida para o sorogrupo B de *N. meningitidis* e a presença de anticorpos para PorA (Jordens *et al.*, 2004).

Recentemente, Trotter *et. al.*, (2007) demonstraram associação entre a incidência de doença causada por MenB e ausência de títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 para crianças de 3 a 11 meses. Porém, diferente do que é esperado, o declínio da DM causada por MenB em crianças de 1 a 10 anos de idade não foi acompanhado pelo aumento da prevalência de títulos bactericidas protetores (≥ 4), indicando que mecanismos alternativos foram responsáveis pela aquisição de imunidade protetora contra MenB nesta faixa etária. Tais mecanismos incluem a maturação cronológica do sistema complemento pela via alternativa (Ferriani *et. al.* 1999), aquisição de anticorpos bactericidas com títulos < 4 (Welsh & Granoff, 2007) e atividade de opsonização (Plested & Granoff, 2008).

A imunidade adquirida para o meningococo envolve a ativação de linfócitos B (LB) e de linfócitos T (LT) específicos. Embora a imunidade protetora contra *N. meningitidis* seja baseada em anticorpos bactericidas (Vermon & Van den Dobbeltstenn, 2002), os LT desempenham um importante papel na regulação da resposta imune, incluindo a estimulação dos LB para a produção de anticorpos. São também responsáveis pela aquisição de memória imunológica e ativação de células fagocíticas que destroem a bactéria. (Romagnani, 2000). OMPs tais como PorA, Opa, Opc presentes em OMVs são capazes de estimular a proliferação *in vitro* de LT após vacinação ou infecção (Vermon & van den Dobbeltstenn, 2002) Weirtz *et al* (1996) demonstraram que há uma hierarquia crescente na imunogenicidade destas moléculas, sendo as proteínas Opa as mais imunogênicas, seguidas por Opc e PorA. Soma-se a isto, a produção de citocinas pelos LT, como, IL-12 e interferon gama (IFT- γ) que podem modular o perfil da resposta T-dependente com predominância de células T *helper 1* (Th1).

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil sorológico de um grupo de doadores de sangue em relação a imunidade natural ao meningococo.

7.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os principais fatores de risco a D.M, como sexo, idade, hábitos tabagistas, alistamento militar e sua relação com a presença de anticorpos bactericidas contra meningococo nos soros de doadores;
- b) Avaliar o nível de imunidade natural do grupo em estudo, procurando identificar diferenças nos títulos de anticorpos contra as cepas de MenB e MenC;
- c) Avaliar o nível de imunidade natural do grupo em estudo, procurando identificar diferenças nos títulos de anticorpos e sua relação com a presença ou não de duas proteínas de membrana externa, PorA e Opa.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Cepas de *N. meningitidis*

Utilizou-se no trabalho 5 cepas de meningococo: Cu385 (B:4,7:P1.19,15), usada na construção da vacina VA-MENGOCCBC[®]; H355 (B:15:P1.19,15), do mesmo subtipo (PorA) que a cepa vacinal, mutantes derivadas da H355; PorA⁻ e Opa⁻. A cepa de MenC utilizada foi a N79/96 (C:2b:P1.10).

8.2 Soros de doadores do banco de sangue

Soros de doadores de sangue (banco de sangue UERJ) foram cedidos pelo Prof. Dr Paulo Damasco e Prof. Dra Ana Luiza M. Guaraldi, UERJ os quais coletaram os sangues no ano de 2002 para análise de anticorpos anti-toxóide diftérico (Damasco *et al.*, 2005). Utilizamos 60 soros na análise de anticorpos anti-MenB e 64 na análise para MenC. A idade dos pacientes variou de 18 a 56 anos.

8.3 Cultivo da bactéria

O inóculo bacteriano estocado a -70°C em TSB (Difco) acrescido de glicerol e lactose a 10% foi semeado em placa de Agar soro (TSB + 2% agar + 1% soro de cavalo) e incubado por 16 a 18 horas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂ (método da vela). Após este tempo, o inóculo foi repicado novamente em placa de Agar soro para crescimento de 4 horas a 37°C em 5% de CO₂ para uso em fase logarítmica de crescimento.

8.4 Ensaio bactericida

Utilizamos o ensaio previamente descrito por Maslanka et al. (1997). Com o crescimento de 4 h preparou-se uma suspensão bacteriana em PBS mais soro albumina a 0,3% (PBS/BSA), em presença de 0,98 mM de cálcio e 1mM de magnésio. Mediu-se a Densidade Óptica (D.O) até que se alcançasse a medida de 0,5 em 590_{nm} o que equivale a 1×10^9 UFC/ml. Tal suspensão foi diluída, posteriormente, até a concentração final de 5×10^3 UFC/ml.

Para a reação bactericida, soros de pacientes (previamente inativados a 56°C por 30 minutos) foram diluídos serialmente em placa de 96 poços em PBS/BSA 0,3%. A reação final (50 µL) continha 25 µL de soro diluído, 12,5 µL de soros humanos como fonte de complemento diluído 1:2, 12,5 µL de suspensão bacteriana a 5×10^3 UFC/ml. A reação foi incubada por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se à placa, TSB/agar 0.9% contendo antibióticos (Vancomicina, 3 µg/mL; Colistina, 7,5 µg/ mL; Nistatina, 12,5 U/mL; Trimetoprin 5 µg/ml) (VCNT; Difco). A placa foi incubada a 37°C por 16 a 18 horas em 5% de CO₂. Contou-se o número de UFC em cada poço da placa com o auxílio de um microscópio estereoscópio (40x), sendo o título definido como a maior diluição capaz de matar 50% de colônias. Como controle positivo foi utilizado um *pool* de soros de camundongos obtidos após a vacinação com a VA-MENGOBC-BC[®], cujo título foi previamente determinado. Como controle negativo e controle da ativação do complemento pela via alternativa utilizamos poços contendo bactéria, tampão e complemento ativo ou inativo.

8.5 Extração das vesículas de membrana externa (OMVs) de MenB

A extração de OMVs foi realizada como descrita anteriormente (Tsai *et al.*, 1981). O inóculo bacteriano, estocado a -70°C, foi semeado em ágar soro e incubado a 37°C por 16 horas em microaerofilia. O crescimento bacteriano foi, então, semeado em um balão com TSB e incubado por aproximadamente 4 horas a 37°C sob agitação (200 rpm; Environ Shaker, Lab-line, USA). Em seguida, 10 ml

deste crescimento foram inoculados em 150 ml de TSB e incubados a 37°C por 16 horas sob agitação (200 rpm).

Após o período de incubação, o crescimento bacteriano foi inativado a 56°C por 40 minutos e centrifugado a 15.400 x g por 20 minutos a 4°C, a fim de sedimentar as células. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em solução de cloreto de lítio 0,2 M e acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0 (5 ml/g de peso úmido celular). Após acrescentar pérolas de vidro, incubou-se a 50°C sob agitação (200 rpm) por 2h. Seguiu-se centrifugação, como descrito anteriormente. O sobrenadante foi coletado e submetido à ultracentrifugação (50.000 x g/75 minutos/4°C), obtendo a sedimentação das OMVs.

O sedimento contendo as OMVs foi ressuspenso com aproximadamente 1 ml do tampão Tris 10 mM, pH 8. Adicionou-se 1% de sarcosyl (Calbiochem, USA), mantendo-se à temperatura ambiente por 30 minutos com agitações ocasionais. Adicionou-se tampão Tris e seguiu-se nova centrifugação a 50.000 x g por 75 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado, sendo o sedimento ressuspenso em tampão Tris.

Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 7.500 x g por 3 minutos e adicionou-se 0,02% azida sódica e 1% de glicerol. As OMVs foram, então, estocadas a - 20°C. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry e a pureza do antígeno foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Tsai *et al.*, 1981)

8.6 SDS-PAGE e análise do perfil das proteínas da membrana externa (OMPs)

Para a análise qualitativa do perfil das OMPs da cepa de MenB (Cu385), os extratos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10%), segundo Laemmli (1970).

Para a corrida eletroforética, volumes iguais da amostra e tampão (Tris 1,5 M pH 8,8 contendo 4% de dodecilsulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol, 10% de mercaptoetanol e 2% azul de bromofenol) foram misturados e submetidos a 100°C

por 5 minutos. Além das amostras, foi adicionado um padrão de peso molecular (Invitrogen, Life Technologies).

A eletroforese foi realizada em mini-géis (7x8 cm, 0,75 mm de espessura). Após a corrida eletroforética a 200 V por aproximadamente 50 minutos o gel foi corado por Coomassie Blue G-250 (Sigma, Steinheim, Germany) e pela prata (Short Protocol in Molecular Biology)

8.7 *Western Blot*

Esta técnica foi utilizada para a análise da especificidade dos anticorpos contra as principais OMPs de MenB presentes nos soros com títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 (n = 15) e outros com títulos de 1:2 (n = 4).

Como descrito anteriormente por Silva Jr *et al.* (2007), inicialmente, as OMPs, 80 μ g por gel, foram transferidas para papel de nitrocelulose (BioRad, poro 0,45 μ m) a 250 mA por 2 horas, mantendo-se o sistema a 4°C. O tampão utilizado na transferência foi Tris 0.025M, glicina 0,19 M e metanol 20%, pH 8,5. Após a transferência, o papel foi corado com corante de Ponceau para confirmar a presença das proteínas e cortado em fitas de aproximadamente 3 mm.

Para a reação imunológica, as fitas foram bloqueadas com PBS-leite 5% por 30 minutos. Seguiu-se com a incubação dos soros testes e controles diluídos a 1:200 na própria solução de bloqueio, à temperatura ambiente por cerca de 18 h e sob agitação. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações. Após este período as fitas foram lavadas 4 vezes por 4 minutos com PBS e incubadas com o segundo anticorpo; anti-IgG+IgM+IgA (Ig total) humana conjugado a peroxidase (KPL) diluído a 1:13.000 em PBS/leite. Após incubação por 1,5 horas a 37°C, nas mesmas condições descritas acima, as fitas foram lavadas e se adicionou o substrato enzimático (0,05% de H₂O₂ 30%) e o reagente de cor (4% de 3-amino-9-etil carbazol, 1% em N,N-dimetilformamida) em tampão acetato (0,05 M) pH 5,0.

8.8 Análise estatística

Os níveis de significância das diferenças entre os grupos foram examinadas por testes t pareado e não pareado (testes paramétricos). Para dados não paramétricos foi usado teste Maan-Whitney (amostras não pareadas) ou Wilcoxon para testes pareados. Estas análises foram realizadas com programa GraphPad Prism, versão 4.02. $P < 0.05$ foi considerado significativo.

9 RESULTADOS

9.1 Características gerais da amostragem

A Tabela 1 apresenta o perfil geral de 56 doadores de sangue, dos quais obtivemos um questionário preenchido, no qual perguntou-se sobre a idade, sexo, alistamento militar e hábitos tabagistas. Além disso, registrou-se o número de habitantes e de cômodos na casa em que residem.

Tais informações tornam-se importantes já que este estudo se propõe a investigar o perfil sorológico de um grupo de representativo da população adulta da cidade do Rio de Janeiro. Nesta amostragem, destaca-se que houve maior frequência de indivíduos do sexo masculino, atingindo 71% do total. Quanto ao alistamento militar, 25% dos indivíduos participaram do serviço militar, todos homens. Em relação à idade, esta variou de 18 a 56 anos, sendo que a média das idades dos indivíduos testados foi de 33 anos e mediana de 32 anos. Um perfil mais detalhado das idades será testado mais a frente quando dois grupos foram separados: um de 18 a 30 anos e outro de 31 a 56 anos. Tal preocupação com o perfil torna-se evidente quando observamos que os principais fatores de risco à D.M são o sexo, sendo o masculino mais acometido pela D.M do que mulheres; a presença em locais de aglomeração de pessoas, como em quartéis; e a proximidade e o convívio próximo das pessoas (Moraes *et al.*, 2005; . Pollard *et al.*, 2004)

Tabela 1 – Características gerais dos doadores de sangue

(n; %)	M (40; 71); F(18; 29)
b. / cômodo	0.8
nte (n; %)	14; 24
o Militar (n; %)	15; 25
(média; mediana)	33; 32
	56

9.1.1 Perfil de fumantes e não fumantes entre os doadores do banco de sangue

Tendo em vista o tabagismo como um fator de risco ao desenvolvimento de D.M, decidimos investigar a proporção de fumantes e não fumantes no grupo amostral, buscando uma correlação com os títulos de anticorpos bactericidas e os hábitos de fumantes.

A tabela 2 expõe o perfil do grupo fumante e não fumante quanto às informações gerais adquiridas através de um questionário. Nesta tabela, observamos que 42 (75%) dos indivíduos testados eram não fumantes. Sendo a idade entre os dois grupos similar quanto à média e mediana.

Para avaliar uma possível influência do hábito tabagista na presença ou não de anticorpos bactericidas contra MenB e MenC, foi feita uma análise estatística da mediana dos títulos de anticorpos bactericidas nos soros testados. Primeiro, comparou-se a mediana dos títulos entre fumantes e não fumantes contra as duas cepas separadamente, ou seja, títulos de anticorpos bactericidas contra MenB em fumantes *versus* títulos contra MenB em não fumantes. Nesta primeira análise, as medianas apresentaram valor igual 1.5. O mesmo repetiu-se para MenC e obtivemos medianas de valor 1. Em seguida, avaliamos de forma cruzada os títulos obtidos contra as duas cepas nos dois grupos de fumantes e não fumantes. Ou seja, comparamos os títulos obtidos contra MenB em fumantes *versus* títulos obtidos contra MenC também em fumantes. O mesmo foi feito para o grupo dos não fumantes. No entanto, nenhuma das análises gerou significância estatística.

Tabela 2 - Características da amostragem de fumantes e não fumantes

	Sexo	Nº Hab. / cômodo	Serviço Militar	Idade (média; mediana)	Total
Fumantes	M (n, %) = 8; 57%	0.6	3; 21%	33,4; 31.5	14
	F (n, %) = 6; 43%				
Não Fumantes	M (n, %) = 30; 71%	0.8	12; 28%	34.1; 34	42
	F (n, %) = 12; 29%				

9.1.2 Distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas por idade dos doadores do banco de sangue

A Tabela 3 apresenta a distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa Cu385 (MenB), por idade. Como alguns soros possuíam dados de idade, mas não as informações gerais usadas acima, estes foram usados da mesma forma e por isso há um número de maior de soros testados nesta análise em relação à idade, como pode ser visto na Tabela 4. A idade dos doadores variou de 18 a 56 anos e por isso dois grupos de 18 a 30 anos e de 31 a 56 anos foram formados e comparados quanto às médias e medianas dos títulos de anticorpos bactericidas obtidos em cada grupo.

Observou-se que os grupos responderam de forma similar, já que a média e mediana de títulos bactericidas contra a cepa Cu385 dos grupos de 18 a 30 anos foi, respectivamente, de 2,6 e 2; e de 31 a 56 anos, respectivamente, de 2,4 e 1. Também não houve diferença na proporção de indivíduos que apresentou títulos protetores de anticorpos bactericidas: o grupo de 18 a 30 anos teve 25% dos indivíduos com títulos ≥ 4 ; já o grupo de 31 a 56 anos apresentou 24% dos indivíduos com títulos ≥ 4 . A análise estatística não revelou significância quanto a mediana dos títulos dos dois grupos.

Como mostrado na Tabela 3, a análise da distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa MenC N79/96 (C:2b:P1.10), da mesma forma que em MenB, apresentou resultados similares quando comparamos os valores das medianas entre os grupos de 18 a 30 anos e de 31 a 56 anos. O primeiro apresentou média e mediana, respectivamente, de 2,2 e 1; já o grupo de 31 a 56 anos apresentou, respectivamente, 6,6 e 1. A análise estatística não revelou significância quanto a mediana comparada entre os dois grupos.

Tabela 3 – Distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas anti-MenB (cepa Cu385) e anti-MenC (cepa N79/96) por idade

Idade			
MenB		MenC	
18 - 30 anos	31 - 56 anos	18 - 30 anos	31 - 56 anos
2.2	2.4	2.2	6.6
2	1	1	1
25	24	14	27
3.7	6	11	18
27	33	27	33

9.2 Análise do perfil sorológico dos indivíduos testados

9.2.1 O nível imunidade dos soros testados

A Tabela 4 detalha os resultados obtidos com todos os soros dos pacientes quanto aos títulos de anticorpos bactericidas contra as cepas de MenB e MenC.

Em geral, os títulos variaram de 0 a 16 contra MenB e 0 a 64 contra MenC. Para se ter uma visão do perfil sorológico dos pacientes testados, analisou-se a proporção de indivíduos que apresentou títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 ou 8, títulos considerados protetores contra *N. meningitidis*. Uma proporção de 26% dos soros apresentaram títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 contra a cepa de MenB e 25% contra MenC. No entanto, um percentual bem maior de soros tinham títulos de anticorpos bactericidas ≥ 8 contra MenC (17% versus 7% para MenB).

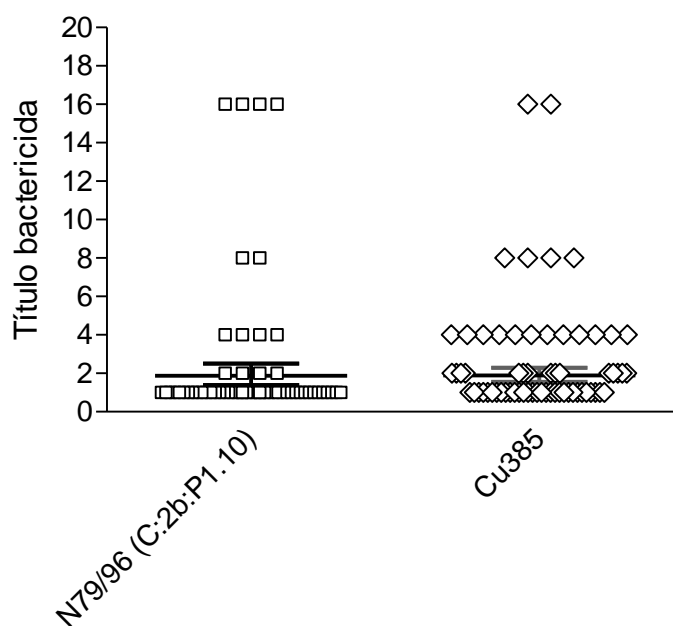
Em relação aos soros com títulos ≥ 4 contra MenB foi obtida a média e mediana, com valores de 2.1 e 2, respectivamente. Já para MenC foi obtida média e mediana, respectivamente, de 5 e 1. Os valores altos de MenC quanto à média podem ser explicados pela presença de alguns indivíduos que obtiveram títulos altos, de até 64, o que aumenta os valores da média.

A média geométrica dos títulos de anticorpos bactericidas contra MenB e MenC também foi avaliada e é mostrada na Figura 1. Não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos bactericidas contra as duas cepas.

Tabela 4 – Perfil do nível de imunidade dos soros testados quanto a presença de anticorpos bactericidas contras as cepas MenB e MenC de *N. meningitidis*

	Média	Mediana	% títulos ≥ 4	% títulos ≥ 8	Total
MenB (Cu385) (B:4,7:P1.19,15)	2	2	26	7	60
MenC (N79/96) (C:2b:P1.10)	5	1	25	17	64

Figura 1 – Títulos de anticorpos bactericidas contra cepas MenB (n = 60) e MenC (n = 64) nos soros de pacientes do banco de sangue



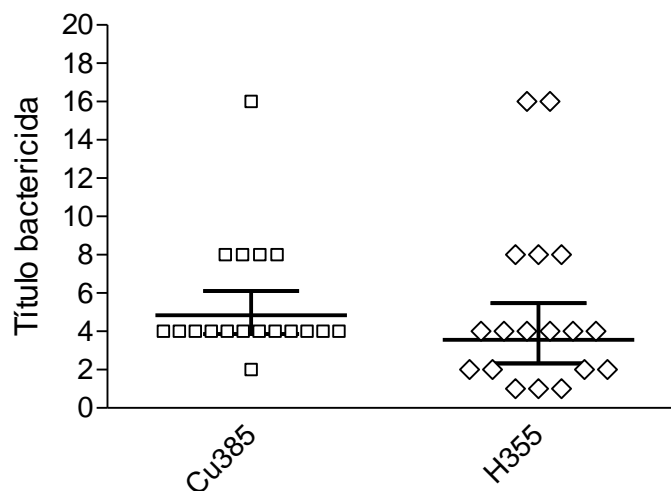
Legenda: Os pontos representam cada individuo e seus respectivos soros. A média geométrica e o erro padrão são mostrados.

9.2.2 Avaliação do perfil sorológico dos doadores frente a diferentes cepas de MenB e suas mutantes

A imunogenicidade de algumas OMPs, como PorA e Opa, já é largamente descrita na literatura. (Silva Jr *et al.*, 2006). Visto isto, analisou-se os títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa Cu385 e uma cepa homóloga H355 e suas mutantes H355 PorA⁻, que não expressa a PorA, e H355 Opa⁻, que não expressa Opa ou OMP de classe 5.

A Figura 2 apresenta a média geométrica obtida entre os títulos de anticorpos bactericidas dos soros dos doadores contra a cepa Cu385 e H355. A figura mostra que não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos contra as duas cepas. A partir de tais resultados, pudemos comparar num segundo momento, o perfil sorológico dos pacientes frente às cepas mutantes, usando como referência a cepa original H355.

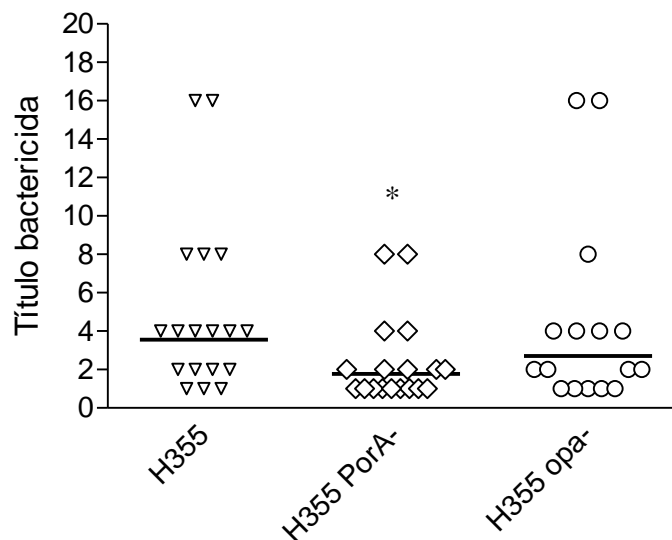
Figura 2 – Títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa Cu385 (n =19) e H355 (n =19) em soros de doadores de banco de sangue



Legenda: Os pontos representam pacientes e seus respectivos soros. A média geométrica e o erro padrão são mostrados.

A Figura 3 apresenta a distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas medidos contra as três cepas supracitadas. Observou-se que as médias geométricas desses títulos contra H355 e H355 Opa⁻ foram significativamente diferentes da média geométrica encontrada contra a cepa H355 PorA⁻, indicando a importância desta proteína na imunidade natural ao meningococo. Tal resultado já foi descrito para indivíduos imunizados com as vacinas OMVs. Porém, quando comparou-se as médias geométricas dos títulos de anticorpos bactericidas contra H355 e H355 Opa⁻ não foi encontrada diferença significativa.

Figura 3 – Títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa H355 e suas respectivas mutantes H355 PorA⁻ e H355 Opa⁻ em soros de doadores de banco de sangue

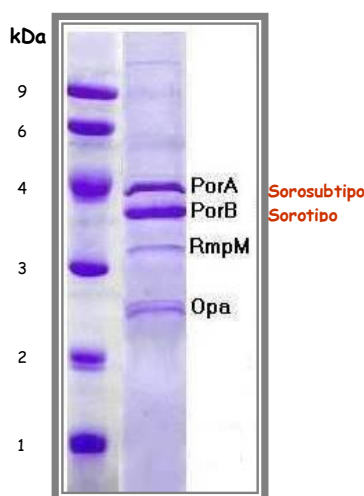


Legenda: Os pontos representam pacientes e seus respectivos soros. A média geométrica e o erro padrão são mostrados.

9.2.3 Avaliação da reatividade de IgG nos soros dos doadores do banco de sangue com OMPs de MenB

Para avaliar a especificidade de IgG anti-MenB presente nos soros dos indivíduos empregamos a reação de imunoblot. A Figura 4 mostra o perfil das OMPs presentes nas OMVs utilizadas nesta técnica. Destacam-se as 5 principais OMPs descritas para o meningococo: PorA, PorB, RmpM ou OMP4 e Opa ou OMP5.

Figura 4 – Perfil de proteínas presentes nas OMVs. Perfil eletroforético das proteínas de membrana externa das OMVs extraídas da cepa Cu385 de *N. meningitidis* B em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)



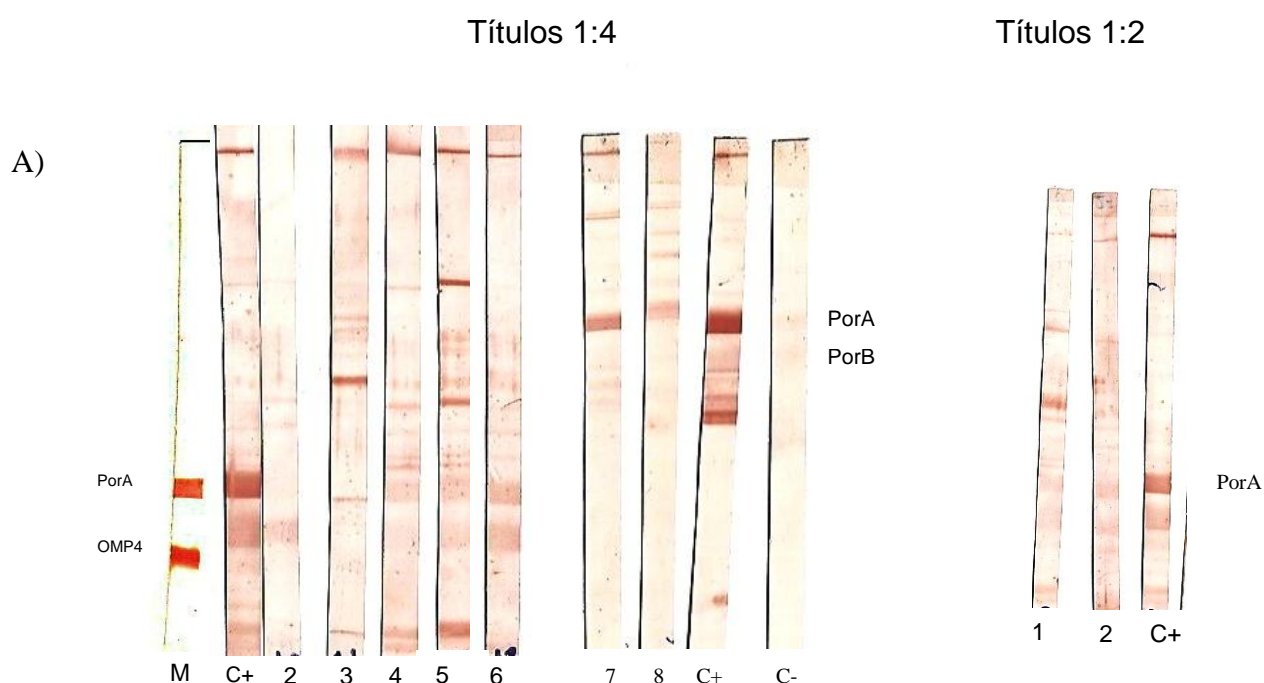
A figura 5 mostra a reatividade de IgG de alguns dos 19 soros selecionados para esta análise. Estes 19 soros possuíam títulos de anticorpos bactericidas que variaram de 2 a 16. A primeira fita (M), Figura 5 representa a reatividade dos anticorpos monoclonais contra PorA e OMP4, utilizados como marcadores das respectivas proteínas.

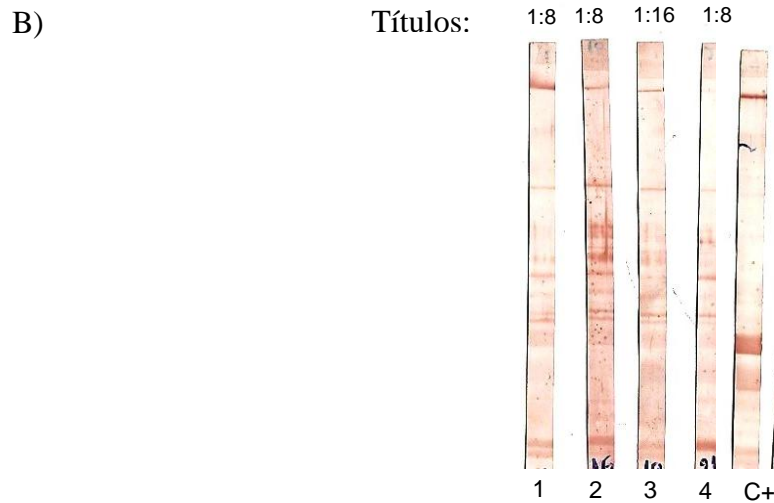
Observamos pela figura que dentre os soros testados, 2 (10.5%; indivíduos 7 e 8; Fig.5A) reconheceram fortemente a proteína PorA e apresentaram título de anticorpos bactericidas igual a 1:2.

Doze (63%) indivíduos reconheceram a PorA com intensidades semelhantes às aquelas mostradas nas fitas 4, 5 e 6. Portanto, cerca de 26% dos soros não reconheceram PorA, como exemplificado nas fitas 2 e 3.

Em relação a PorB, observamos que 8 (67%) indivíduos reconheceram a proteína fracamente como mostra as fitas 4 e 5 (Fig.5A). Conforme pode ser visto na Figura 5 (fitas 3-7) uma proteína de alto peso molecular (no topo da fita) foi reconhecida pela maioria dos soros testados (83%), assim como diversas outras proteínas acima da PorA. Não identificamos nenhuma reação positiva com a proteína OMP4, mas observamos reatividade em todos os soros com uma banda de baixo peso molecular, sugestiva de ser a molécula de LOS ou Opa. A Figura 5B mostra a reatividade dos soros com os maiores títulos de anticorpos e não houve reconhecimento forte de PorA. Observamos também que soros com títulos 1:2 reconheceram PorA e PorB fracamente e diversas outras proteínas. Desta forma não encontramos correlações entre o reconhecimento de PorA ou outra proteína conhecida com os títulos de anticorpos bactericidas.

Figura 5 – Reatividade de IgG (Western-blot) de soros de doadores com diferentes títulos de anticorpos bactericidas contra OMPs da cepa Cu385



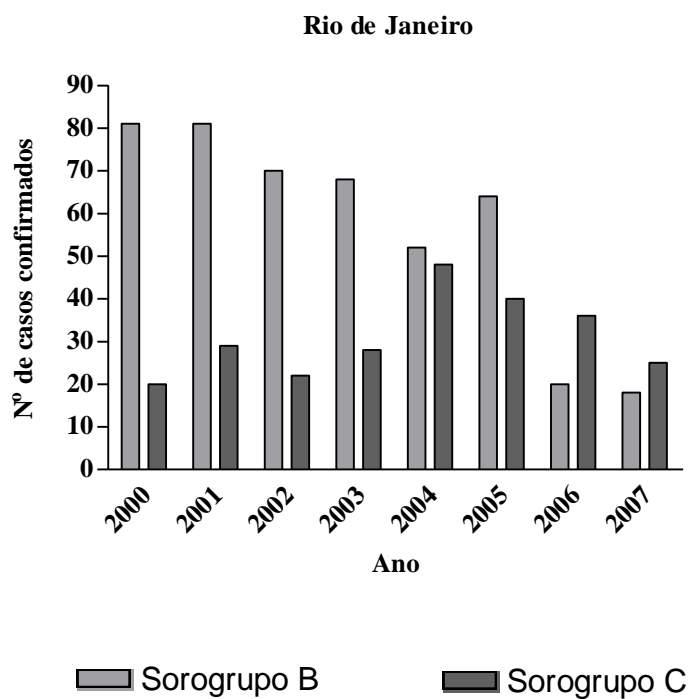


Legenda: A) soros com títulos de anticorpos bactericidas de 1:4 e 1:2; B) soros com títulos de anticorpos bactericidas de 1:8 e 1:16. M = reação com os anticorpos monoclonais anti-PorA e OMP4; C+ = soro de um indivíduo vacinado contra MenB (VA-MENGOC-BC[®]), com título de anticorpo bactericida = 1:256, utilizado como controle positivo em todas as reações.

9.3 Prevalência dos sorogrupos B e C no Rio de Janeiro antes e após a coleta dos soros

A figura abaixo mostra o número de casos confirmados de MenC e MenB no Rio de Janeiro, anos 2000 a 2007.

Observamos uma queda gradual dos casos por sorogrupo B, com diferenças importantes nos anos de 2006 e 2007. De forma interessante, a prevalência do sorogrupo C teve aumentos visíveis nos anos de 2004 a 2006. No ano de 2002, o número de isolados do sorogrupo B foi cerca de 3 vezes maior que o de sorogrupo C.



Fonte: COVER-SINAN/DEVEP/SVS/MS.

10 DISCUSSÃO

Apesar da disponibilidade de agentes antimicrobianos eficazes contra *N. meningitidis*, a DM continua sendo um dos principais problemas de Saúde Pública em todo o mundo (Borrow *et al.*, 2005). Dentre os vários sorogrupos de *N. meningitidis* causadores de doenças, MenB é o de maior preocupação, já que as vacinas desenvolvidas até o momento, compostas por OMVs, apresentaram eficácia bastante limitada (Jodar *et al.*, 2002).

Em estudo das características do perfil fenotípico de *N. meningitidis* no período de 1990 a 2001 (Lemos *et al.*, 2006), ano imediatamente inferior ao da coleta de soros usados neste estudo, mostrou-se que, em todo o período, o fenótipo B:4:P1.19,15, o mesmo usado nesta dissertação, foi predominante contando com 54% dos isolados de MenB. Cerca de 34% dos isolados de 1990 a 2001 era do sorogrupo C. O fenótipo C:2b:P1.10 foi responsável por surtos no Rio de Janeiro entre os anos de 1994 e 1996 [Barroso *et al.*, 1996]. A partir de 97 surgiu um novo fenótipo. C:23:P1.14-6 (Lemos *et al.*, 2006) Estes dados justificam o uso, neste estudo, de cepas de MenB e MenC na pesquisa da imunidade natural ao meningococo.

O conhecimento da imunidade natural ao meningococo é importante para a pesquisa de potenciais alvos antigênicos e também para se conhecer a história da circulação dos diferentes fenótipos da bactéria na população. Há registros de aumento da taxa de portador em períodos prévios ao início de epidemias (Yazdankhah & Caugant, 2004). Este estudos também colaboram para revelar a dinâmica portador *versus* D.M e entender o potencial efeito de programas de controle como a vacinação (Christensen *et al.*, 2010).

Nesta dissertação analisamos o perfil sorológico de um grupo de indivíduos doadores de sangue quanto a presença de imunidade natural (anticorpos bactericidas) e as características gerais da população como descritas acima.

Na primeira parte deste trabalho, buscamos apresentar um perfil geral da amostragem dos indivíduos estudados. Este perfil levou em conta fatores de risco para o desenvolvimento de DM descritos na literatura (Findlow *et al.*, 2007; Welsh & Granoff, 2007; Rezaei *et al.*, 2010). Primeiramente, nós avaliamos a influência do tabagismo. Aqui neste estudo confrontamos as medianas dos títulos de anticorpos

bactericidas contra MenB e MenC nos grupos fumantes e não fumantes. Valores ligeiramente maiores de títulos de anticorpos bactericidas contra MenB e MenC foram encontrados em doadores fumantes quando comparados com os não fumantes. Os dados da literatura mostram maiores títulos de anticorpos em indivíduos fumantes (Davies *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2010). Estes títulos maiores podem estar relacionados à maior susceptibilidade de indivíduos fumantes em serem portadores do meningococo, já que a defesa da mucosa deve estar prejudicada.

Em seguida, partimos para uma análise da distribuição dos títulos de anticorpos bactericidas por idade, já que este é um dos mais importantes fatores que influenciam na taxa de indivíduos portadores de MenB. Não observamos diferenças significativas entre os 2 grupos etários estudados, mas o ideal seria que tivéssemos indivíduos dentro da faixa etária dos adolescentes e crianças, o que envolveria uma outra população que não doadores de sangue. A ausência de significância estatística também pode estar associada ao baixo número amostral.

Títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 são considerados protetores contra o MenC, mas ainda há dúvidas quanto ao título protetor para o MenB (Goldschneider *et al.*, 1960; Yazdankhah & Caugant, 2004; Borrow *et al.*, 2005). Nossos dados mostraram uma tendência de indivíduos mais velhos (31 a 56 anos), possuírem maior índice de proteção quando comparado com os indivíduos mais novos (18 a 30 anos) (Tzeng & Stephens, 2000).

Partindo para o objetivo principal deste estudo, iniciamos uma série de análises levando em conta os títulos bactericidas contra MenB e MenC. Foi encontrado num primeiro momento, resultados similares quanto à mediana dos títulos contra as duas cepas bacterianas. Porém, a média dos títulos bactericidas contra MenC foi cinco vezes maior que contra MenB. Isto pode ser explicado pelo valor alto de alguns títulos medidos que chegaram ao valor de 64, enquanto que em MenB o maior título foi de 16. A porcentagem de títulos ≥ 8 foi também maior em MenC do que em MenB. Isto mostra que pode haver uma maior susceptibilidade na população ao meningococo B do que ao meningococo C. Tal fato pode ser explicado pela baixa imunogenicidade do polissacarídeo capsular de MenB. (Wyle *et al.*, 1972; Borrow *et al.*, 2005). É visto também que adultos possuem baixos níveis de anticorpos no soro contra polissacarídeo capsular de MenB e baixas respostas bactericidas contra antígenos não capsulares. Além disso, altos níveis de anticorpos

podem ser encontrados contra cápsula polissacarídica de meningococo A e C em adultos (Horton *et al.*, 2009). Os dados epidemiológicos mostraram que MenB era cerca de 3 vezes mais prevalente que MenC em 2002. No entanto, a partir de 2003, a frequência de MenC começou a se elevar, atingindo os maiores níveis em 2004 e 2006. Desde 2002, MenC prevalece sobre MenB na maioria dos Estados do Brasil. (SINAN/SVS/MS(b)). Embora nossos dados revelem um percentual similar de indivíduos com títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 para MenB e MenC, é interessante observar que um maior percentual (17%) de indivíduos tinham títulos de anticorpos ≥ 8 contra MenC quando comparados com MenB (7%). Se esta diferença tem alguma implicância na crescente prevalência de MenC a partir de 2003 merece estudos adicionais.

A especificidade da resposta de anticorpos bactericidas foi avaliada através do emprego de cepas mutantes de PorA e Opa. Os resultados desta dissertação, mostraram que os títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa PorA- foi significativamente inferior a cepa original (H355) indicando um papel proeminente desta proteína na imunidade natural ao meningococo, conforme já descrito na literatura para indivíduos vacinados (Milagres *et al.*, 1998; Wedege *et al.*, 1998; Milagres *et al.*, 2000). Estudos anteriores sobre imunidade de portadores também mostrou associação entre atividade bactericida contra MenB e a presença de anticorpos contra a PorA (Silva Jr, *et al.*, 2005). Outro estudo com universitários, mostrou que alguns indivíduos apresentaram redução significativa nos níveis de anticorpos bactericidas contra cepas PorA (Jordens *et al.*, 2004). No entanto, em um estudo que mediu os níveis de anticorpos IgA na saliva de estudantes, mostrou a presença de anticorpos contra cepas de meningococo que não expressavam PorA, indicando que, além de PorA, outros antígenos como PorB podem estar envolvidos na resposta de IgA de anticorpos (Horton *et al.*, 2005). Não observamos diferenças significativas nos títulos de anticorpos bactericidas quando a cepa Opa- foi utilizada. No entanto, esta proteína é muito importante para a colonização da nasofaringe e talvez a pequena expressão de Opa na cepa H355 tenha influenciado a não detecção de anticorpos líticos específicos para a mesma. Alternativamente, esta é uma proteína que apresenta grande variação antigênica e variação de fase, o que dificulta a detecção da resposta imune específica.

Para fazer uma análise qualitativa da reatividade de IgG anti-meningococo dos soros, utilizamos a reação de Western-blot. Em geral, houve uma fraca

reatividade de IgG com PorA e PorB, diferente da resposta de vacinados (Milagres, 1994). Não observou-se correlações importantes entre as reações de Western-blot e os títulos bactericidas.

Em suma, esta dissertação mostrou a existência de uma elevada taxa (cerca de 25%) de indivíduos adultos com imunidade protetora aos dois sorogrupos de meningococo prevalentes na região e no país (sorogrupos B e C). Outra informação importante foi que os anticorpos bactericidas presentes nos soros destes indivíduos apresentaram um forte reconhecimento de PorA, a proteína que tem sido destacada na indução de anticorpos líticos em indivíduos vacinados.

CONCLUSÕES

- a) Detectou-se proporções similares (~ 25%) de doadores de sangue com títulos de anticorpos bactericidas anti-MenB e anti-MenC, apesar da grande diferença na prevalência de MenB em relação a MenC;
- b) Em geral, os títulos de anticorpos contra MenC foram maiores que contra MenB;
- c) Embora sem significância estatística houve uma tendência de hábitos tabagistas estarem associados com a presença de anticorpos bactericidas especialmente contra MenC;
- d) Dentro da faixa etária estudada (18 a 56 anos) observou-se que uma maior proporção de indivíduos mais velhos (31 a 56 anos) possuía anticorpos bactericidas contra MenC;
- e) PorA mostrou ser importante na geração de imunidade natural contra o meningococo, pois sua ausência foi associada com baixos índices de títulos de anticorpos contra MenB;
- f) Não observou-se correlações importantes entre as reações de Western-blot e os títulos de anticorpos bactericidas.

REFERÊNCIAS

- Ala'Aldeen DA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-van-Tam JS, English A, Falla TJ, et al. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2311-16.
- Balmer P, Miller E. Meningococcal disease: how to prevent and how to manage. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 275-81.
- Bencic Z, Kuzmanovic N, Amsel V, John V. Duration of the *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 2 carrier state. *Lijec Vjesn* 1991; 113: 384-86.
- Bennett JS, Griffiths ND, McCarthy KL, Sleeman KA, Jolley DW, Crook, Maiden MC. Genetic diversity and carriage dynamics of *Neisseria lactamica* infants. *Infect Immun* 2005; 73: 2424-32.
- Bjune EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodkin PD, Tarlton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med* 2005; 201: 545-54.
- Blackwell CC, Weir DM, James VS, Todd WT, Banatvala N, Chaudhuri AK, Gray, Thompson EJ, Fallon RJ. Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 1990; 104: 203-9.
- Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogates of protection – serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 2005; 23: 2222-27.
- Bovre K. Neisseriaceae. In: Krieg NR & Holt JG ed *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, 1984. Vol 1. p. 288-296.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, CENEPI. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Informes Técnicos Institucionais, 2009.
- Callaghan MJ, Keith AJ, Maiden MC. Opacity-associated adhesin repertoire in hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2006; 74 (9): 5085-94.
- Capecchi B, Adu-Bobie J, Di Marcello F, Ciucchi L, Masignani V, Taddei A, Rappuoli, R, Pizza M, Arico B. *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2005; 55: 687–98.
- Cardenosa N, Dominguez A, Orcau A, Panella H, Godoy P, Minguell S, Camps N, Vazquez JA. Carriers of *Neisseria meningitidis* in household contacts of meningococcal disease cases in Catalonia (Spain). *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 877-84.
- Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. The stonehuse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* 1987; 99: 591-601.

Caugant DA, Høiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, Wedege E, Eng J, Froholm LO. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 323-30.

Caugant DA, Hoiby EA, Rosenqvist, E Froholm LO, Selander RK. Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. *Epidemiol Infect* 1992; 109: 241-53.

Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 853-61.

Davies AL, O'Flanagan D, Salmon R, Coleman RL. Risk factors for *Neisseria meningitidis* carriage in a school during a community outbreak of meningococcal infection. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 259-66.

Damasco PV, Pimenta FP, Filardy AA, Brito SM, Andrade AFB, Lopes GS, Hirata RJ, Mattos-Guaraldi AL. Prevalence of IgG diphtheria antitoxin in blood donors in Rio de Janeiro. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 911-14.

De Wals P, Gilquin C, De Maeyers S, Bouckaert A, Noel A, Lechat MF, et al. Longitudinal study of asymptomatic meningococcal carriage in two Belgian populations of schoolchildren. *J Infect* 1983; 6: 147-56.

Ende A, Hopman CT, Dakert J. Multiple mechanisms of phase variation of PorA in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2000; 68 (12): 6685-90.

Evans CM, Pratt CB, Matheson M, Vaughan E, Findlow J, Borrow R, Gorringer A, Read RC. Nasopharyngeal colonization by *Neisseria meningitidis* and induction of protective immunity against *Neisseria meningitidis*. *Clin Infect Dis* 2011; 52(1): 70-7.

Feiring B, Fuglesang J, Oster P, Naess LM, Helland OS, Tilman S, Rosenqvist E, Bergsaker MAR, Nøkleby H, Aaberge IS. Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 790-796.

Ferriani VP, Barbosa JE, de Carvalho IF. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 e factor B titres in healthy children. *Acta Paediatr* 1999; 88: 1062-6.

Fillipis I, Andrade CF, Silva I, Prevots DR, Vicente AC. PorA variable antigenic regions VR1, VR2 and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroup B and C isolated in Brazil de 1999 to 2004. *Infect Immun* 2007; 75 (7): 3683-85.

Findlow J, Borrow R, Snape MD, Dawson T, Holland A, John TM, et al. Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant meningococcal serogroup B vaccine and without outer membrane vesicles, administered in infancy. *Clin Infect Dis* 2010; 51(10): 1127-37.

Findlow J, Holland A, Andrews N, Weynants V, Stolongo F, Balmer P, Poolman J, Borrow R. Comparison of phenotypically indistinguishable but geographically distinct *Neisseria meningitidis* group B isolates in a serum bactericidal antibody assay. *Clin Vaccine Immunol* 2007;P.1451-57.

Finne J, Leinonen M, Makela PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 1983; 2: 355-357.

Frasch CE. Development of meningococcal serotyping. In: Vedros, NA. *Evolution of meningococcal disease*. Florida, CRC Press 1987; p. 39-54.

Gioia CAC, Sousa AB, Cruz SC, Silva-Junior FC, Andrade AFB, Sassi RM, Frasch CE, Milagres LG. Effect of a booster dose of serogroup B meningococcal vaccine on antibody response to *Neisseria meningitidis* in mice vaccinated with different immunization schedules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 40: 35-42.

Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. *Vaccine* 2006; 24: 4692-4700.

Glitza IC, Ehrhard I, Muller-Pebody B, Reintjes R, Breuer T, Ammon A, Sonntag HG. Longitudinal study of meningococcal carrier rate in teenagers. *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211: 263-72.

Gold R, Goldshneider I, Lepow ML, Draper TF, Randolph M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* 1978; 137: 112-121.

Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC. Immune response of human infants of polysaccharide vaccines of group A and C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1977; 136: S31-S35.

Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969; 129: 1307-1326.

Gonzalez LA, Paredes CF, Pérez LF, Preciado JIS. Enfermedad por meningococo, *Neisseria meningitidis*: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. *Salud Publica Mex* 2004; 46: 438-450.

Harrison LH, Jolley KA, Shutt KA, Marsh JW, O'Leary M, Sanza LT, et al. Antigenic shift and increase incidence of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2006; 193 (9): 1266-74.

Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology meningococcal disease. *Vaccine* 2009; 27S: B51-B63.

Harrison LH. Epidemiological profile of meningococcal disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 37-44.

Hill JD, Griffiths NJ, Borodina E, Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonizations and invasive disease. *Clin Sci* 2010; 118: 547-64.

Hoang LM, Thomas E, Tyler S, et al. rapid and fatal meningococcal disease due to a strain of *Neisseria meningitidis* containing the capsule null locus. *Clin Infect Dis* 2005; 40: e38-e42.

Holst J, Feiring B, Fuglesang JE, RØiby EA, Nokleby H, Aaberge IS, Rosenqvist E. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* 2003; 21: 734-737.

Horton RE, Stuart J, Christensen H, Borrow R, Guthrie T, Davenport1, Finn A, Williams NA, Heyderman RS. Influence of age and carriage status on salivary IgA to *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 883-9.

Horton RE, Vidarsson G, Virji M, Williams NA, Heyderman RS. IgA1 antibodies specific for outer membrane protein PorA modulate the interaction between *Neisseria meningitidis* and the epithelium. *Microbial Pathog* 2009; 46: 253-60.

Ingalls RR, Lien E, Golenbock DT. Differential roles of TLR2 and TLR4 in the host response to gram-negative bacteria: lessons from a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 411-5

Jodar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 2002; 359: 1499-508.

Jordens JZ, Jeannette NW, Graeme RJ, Christodoulides M, Heckels JE. Development of immunity to serogroup B meningococci during carriage of *Neisseria meningitidis* in a cohort of university student. *Infect Immun* 2004; 72(11): 6503-10.

Kleijn E, van Eijndhoven L, Vermont C, Kuipers B, van Dijken H, Rumke H, et al. Serum bactericidal activity and isotype distribution in toddlers and schoolchildren after vaccination with RIVM hexavalent PorA vesicle vaccine. *Vaccine* 2001; 20(3): 352-8.

Kvalsvig AJ, Unsworth DJ. The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol* 2003; 56: 417-22.

Larrauri A, Cano R, Garcia M, Mateo S. Impact and effectiveness of meningococcal C conjugate vaccine following its introduction in Spain. *Vaccine* 2005; 23: 4097-100.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Lee CC, Middaugh NA, Stephen RCH, Ezzati M. Association of secondhand smoke exposure with pediatric invasive bacterial disease and bacterial carriage: a systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2010; 7(12): 1-11.

Lemos AP, Brandão AP, Gorla MC, Paiva MV, Simonsen V, Meles CA. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. *J Med Microbiol* 2006; 55: 751-57.

Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson KBJ, Haraken HS, Dykes JK, et al. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. *Clin Diag Lab Immunol* 1997; 2:132-7.

Milagres LG, Gorla MCA, Rebelo MC, Barroso DE. Bactericidal antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup B in patients with bacterial meningitis: effect of immunization with na outer membrane protein vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28: 319-27.

Milagres LG, Gorla MCA, Sachi CT, Rodrigues MM. Specificity of bacterial antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with na outer membrane vaccine. *Infect Immun* 1998; 66: 4755-61.

Milagres LM, Gorla MCA, Sacchi CT, Rodrigues, MM. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. *Infect Immun* 1998; 66: 4755-4761.

Milagres LG, Ramos SR, Sacchi D, Melles CE, Vieira VS, Sato H, Brito GS, Moraes JC, Frasch CE. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine. *Infect Immun* 1994; 62: 4419-4424.

Moller AS, Bjerre A, Brusletto B, Joo GB, Brandtzaeg O, Kierulf P. Chemokine patterns in meningococcal disease . *J Infect Dis*; 191: 768-75.

Moraes JC, Barata RB. Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics. *Cad Saude Publica* 2005; 21(5): 458-71.

Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sachi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil. *Lancet* 1992; 340(8827): 1074-8.

Neal KR, Nguyen-van-Tam JS, Jeffrey N, Slack RC, Madeley RJ, Ait-Tahar K, Job K, Wale MC, Ala'Aldeen DA. Changing carriage rate of *Neisseria Meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study. *BMJ* 2000; 320, 846-49.

Pace D, Pollard AJ. Meningococcal A, C, Y and W-135 polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Arch Dis Child* 2007; 92: 909-15.

Petola H. Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis* 1984; 5:71-91.

Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Cmanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000; 287: 1816-20.

Plested JS, Granoff DM. Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 799-804.

Poland GA. Prevention of meningococcal disease: current use of polysaccharide and conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 45-53.

Pollard AJ. Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(12): 274-79.

Pollard AJ, Frash C. development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2001; 19: 1327-46.

Ramsey ME, Andrews NJ, Trotter CL, Kaczmarski EB, Miller E. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccine in England: database analysis. *BMJ* 2003; 326: 365-6.

Romagnani P, Annuziato F, Piccine MP, Maggi E, Romagnani S. Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 510-1.

Rosenqvist E, Musacchio A, Aase A, Høiby EA, Namork E, Kolberg J, Wedege E, Delvig A, Dalseg R, Michaelsen TE, Tommassen J. Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (Rmp) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1999; 67: 1267-1276.

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes M. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2003; 344: 1378-1388.

Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, Ribeiro AF, Kemp B, Gorla MC, Albernaz RK, Marques EG, Cruciano A, Waldman EA, Brandileone MC, Harrison LH; São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team. Incorporation of **real-time PCR** into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011; 6(6):e20675.

Sanchez S, Troncoso G, Criado MT, Ferreira CM. *In vitro* induction of memory-driven responses against *Neisseria meningitidis* by priming with *Neisseria lactamica*. *Vaccine* 2002; 20: 2957-63.

Sanchez S, Troncoso G, Ferreira CM, Criado MT. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and commensal *Neisseria*. *Vaccine* 2001; 19: 3390-98.

Schmitt C, Villwock A, Kurzai O. Recognition of meningococcal molecular patterns of innate immune receptors. *Int J Med* 2009; 299: 9-20.

Schneider MC, Exley RM, Ram S, Sim RB, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol* 2007; 15 (5).

Segal E, Hagblom, P, Seifert HS, So M. Antigenic variation of gonococcal pilus involves assembly of separated silent gene segments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986; 83: 2177–81.

Siamak YP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004; 53: 821-32.

Sierra GV, Campa HC, Vacacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection Trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991; 14:195-207.

Silva Junior FC, Gioia CAC, Oliveira JM, Cruz SC, Frasc CE, Milagres LG. Differential capacities of outer membrane proteins from *Neisseria meningitidis* B to prime the murine immune system after vaccination. *Scand J Immun.* 2007; 65: 1-7.

Sim RJ, Harrison MM, Moxon ER, Tang CM. Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* 2000; 356: 1653-54.

SINAN/SVS/MS – Sistema Nacional de Agravos Notificáveis, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Publica* 2005, 39: 139-40.

SINAN/SVS/MS(b) – Sistema Nacional de Agravos Notificáveis, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Publica*. Dados atualizados em: 25/03/2011.

Snape MD, Pollard AJ. Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 21-30.

Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007; 369: 2196-210.

Tomassen J, Vermeij P, Struyve M, Benz R, Poolman JT. Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (PorA) and class 3 (PorB) outer membrane proteins. *Infect Immun* 1990; 58: 1355-1359.

Troncoso G, Sanchez S, Morda M, Criado MT, Ferreiros CM. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* strains. *Immun Med Microbiol* 2000; 27: 103 9.

Trotter CL, Andrews NJ, Kaczmarski EB, Miller E, Ramsey ME. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet* 2004; 364:365-7.

Trotter CL, Edmunds WJ, Ramsay ME, Miller E. Joint Committee on Vaccines and Immunisation. Proposed changes to the routine childhood immunization schedule, 2006. *Hum vaccine* 2006; 2: 68-73.

Trotter CL, Findlow J, Balmer P, Holland A, Brachha R, Hamer N, Andrews N, Miller E, Borrow R. Seroprevalence of bactericidal and anti-outer membrane vesicle antibodies to *Neisseria meningitidis* group B in England. *Clin Vaccine Immun* 2007; 14(7): 863-68.

Trotter CL, Gay NJ, Edmunds WJ. The natural history of meningococcal carriage and disease. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 556-66.

Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 1981; 146: 69-78.

Tyski S, Grzybowska W, Dulny G, Berthelsen L, Lind L. Phenotypical and genotypical characterization of *Neisseria meningitidis* carrier strains isolated from Polish recruits in 1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 350-53.

Tzeng YL, Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect* 2000; 2: 687-700.

van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JWM. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 144-166.

Vaughan AT, Gorrington A, Davenport V, Williams NA, Heyderman RS. Absence of mucosal immunity in the human upper respiratory tract to the commensal bacteria *Neisseria lactamica* but not pathogenic *Neisseria meningitidis* during the peak age of nasopharyngeal carriage. *J Immun* 2009; 182: 2231-40.

Vermont C, van den Dobbelaert G. *Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection. *FEMS Immun Med Microbiol* 2002; 34: 89-96.

Voer RM, Liesbeth M, Schepp RM, Greef C, van Gageldonk PG, Melker HE, Sanders EA, Berbers GA, van der Klis FR. Immunity against *Neisseria meningitidis* serogroup C in the Dutch population before and after introduction of the meningococcal C conjugate vaccine. *Plos One* 2010; 5(8): 1-9.

Vogel U, Claus H, von Muller, Bunjes D, Elias J, Frosch M. Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2898-2901.

Wanterbeemd BV, Streetland M, Peter VL, Zomer B, Dijken HV, Martens D, Wijffels R, Pol LV. Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using

genetically engineered strains and detergent-free purification process. *Vaccine* 2010; 28: 4810-16.

Wedegge EE, Hoiby EA, Rosenqvist E, Bjune G. Immune responses against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect Immun* 1998; 66: 3223-31.

Wedegge EE, Høiby EA, Rosenqvist E, Bjune G. Immune responses against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccines and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect Immun* 1998; 66: 3223-3231.

Welsch JA, Dan Granoff. Immunity to *Neisseria meningitidis* group B in adults despite lack of serum bactericidal antibody. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(12): 1596-1602.

Wiertz EJHJ, Delvig A, Donders EMLM, Brugghe HF, van Unen LMA, Timmermans HAM, et al. T-cell responses to outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: comparative study of the Opa, Opc and PorA proteins. *Infect Immun* 1996; 183(3): 1151-9.

Wyle FA, Artenstein MS, Brandt BL, Tramont EC, Kasper DL, Alfieri PL, et al. Immunological response of man to group B meningococcal polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 1972; 126: 514-22.

Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004; 53: 821-832.

Zimmer SM, Stephens DS. Serogroup B meningococcal vaccines. *Curr Opin Invest Drugs* 2006; 7: 733-9.