

MARIA CECÍLIA OUTEIRO GORLA

**Resposta Imune a uma vacina protéica
antimeningocócica B :**

estudo da influência de intervalos de tempo entre as imunizações

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Coordenação dos
Institutos de Pesquisa da Secretaria de
Estado da Saúde de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

SÃO PAULO

2003

MARIA CECÍLIA OUTEIRO GORLA

**Resposta Imune a uma vacina protéica
antimeningocócica B :**

estudo da influência de intervalos de tempo entre as imunizações

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna

SÃO PAULO

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro Técnico de Documentação – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gorla, Maria Cecília Outeiro

Resposta imune a uma vacina protéica antimeningocócica B: estudo da influência de intervalos de tempo entre as imunizações / Maria Cecília Outeiro Gorla. – São Paulo, 2003.

Dissertação (mestrado)--Programa de Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Dr. Osvaldo Augusto Sant' Anna

1. Vacinas bacterianas 2. Vacinas meningocócicas 3. Esquemas de imunização
4. Modelos animais

SES/CIP/CTD-002/03

Dedico essa pesquisa aos meus pais,
José e Beatriz

Nada há a subtrair, nada a acrescentar às maravilhas de Deus; elas são incompreensíveis. Quando o homem tiver acabado, então estará no começo; e quando cessar a pesquisa, ficará perplexo."

(Eclo 18, 5-6)

Agradecimento Especial

Ao Dr. Osvaldo Augusto Sant´Anna
pela dedicação com que orientou meu trabalho

AGRADECIMENTOS

A DEUS que me fortalece me ilumina e me dá a vida.

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

Aos membros titulares da Banca examinadora da Qualificação da dissertação, Dr. Carmo Elias Andrade Melles, Dr^a. Raquel Bellinati Roberts Pires, Dr^a. Denise Vilarinho Tambourgi e aos membros suplentes Dr^a. Maria Cristina Cunto Brandileone e Dr^a. Wafa Hanna Cabrera pelos comentários, correções e valiosas sugestões.

Às equipes das Secretarias e às Comissões do Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa pela amizade e dedicação.

A Lilian e Sandra, bibliotecárias do Centro Técnico de Documentação da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Aos colegas Vera, Angela, Ana Paula, Glória, Angela Cristina, Rosemeire, Ana Terezinha, Célia, Regina Fuches, Júlia, Elizabeth Gaspari, Vaneide, Sérgio, Paulo, Lucila Fukazawa, Teresa, Luci, Carin e Adriana Pechi pelo companheirismo e colaboração científica na realização desse trabalho.

Aos amigos Dr. Cláudio Tavares Sacchi e Dr^a. Lucimar Gonçalves Milagres pela contribuição em minha formação científica e pelas sugestões dadas a esse trabalho.

À Dr^a. Rocilda P.F. Schenkman e Dr^a. Martha Tanizaki, pesquisadoras do Instituto Butantan, pela amizade e parceria científica que tem permeado nosso trabalho.

Aos Serviços de Biotério, Fotomicrografia, Microscopia Eletrônica, Meios de Cultura e Cultura Celular, pelo apoio técnico inestimável.

Aos funcionários dos Setores de Apoio da Seção de Bacteriologia: Sueli, Abdovalda, Paulo, Gil, Nildete e Conceição pela amizade e colaboração.

A todos meus amigos e companheiros de trabalho da Seção de Bacteriologia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa.

Ao meu irmão Luís Antônio pela colaboração na revisão gramatical dessa dissertação.

À Dr^a. Cristina Turazzi e Dr^a. Fátima por me acompanharem nessa conquista.

Ao José Carlos, Beto, Lídia, Sueli e a toda minha família pelo carinho e incentivo.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVO | 23 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 Vacina experimental contra meningococo B | 24 |
| 3.1.1 Extração das vesículas de membrana externa | 24 |
| 3.1.2 Extração e destoxificação do LOS | 25 |
| 3.1.3 Formulação da vacina | 26 |
| 3.2 Animais | 26 |
| 3.2.1 Primeira Fase | 26 |
| 3.2.2 Segunda Fase | 27 |
| 3.3 Estudo da resposta imune humoral induzida pela vacina | 29 |
| 3.3.1 Dosagem das concentrações de IgG específicas | 30 |
| 3.3.2 Atividade bactericida dos soros | 32 |
| 3.3.3 Especificidade da resposta imune | 34 |
| 3.4 Análise estatística dos dados | 36 |
| 4. RESULTADOS | 37 |
| 4.1 Níveis de IgG e anticorpos bactericidas | 37 |
| 4.2 Especificidade da resposta imune | 48 |
| 5. DISCUSSÃO | 51 |
| 6. CONCLUSÕES | 59 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

ANEXOS

- | | |
|----------------|---|
| Anexo 1 | Trabalho a ser submetido para publicação |
| Anexo 2 | Parecer da Comissão de Ética do Instituto Adolfo Lutz |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| BCIP | <i>p</i> -toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfatase |
| CRM ₁₉₇ | Mutante não-tóxica da toxina diftérica |
| dLOS | Lipooligossacarídeo destoxificado |
| DO | Densidade ótica |
| DOC | Desoxicolato de sódio |
| EDDA | Ácido etileno-diamino di- <i>o</i> -hidroxifenilacético |
| EDTA | Ácido etileno-diaminotetracético |
| ELISA | "Enzyme-linked immunosorbent assay" |
| ETs | "Electrophoretic Types" |
| Fab | "Fragment antigen binding" |
| Hib | " <i>Haemophilus influenzae</i> type b" |
| HmbR | "Haemoglobin-binding outer membrane protein" |
| HpuAB | "Haemoglobin-haptoglobin binding proteins" |
| Ig | Imunoglobulina |
| KDO | Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-octonato |
| LAL | " <i>Limulus</i> amoebocyte lysate" |
| LAMPs | "Lysosome-associated membrane proteins" |
| Lbps | "Lactoferrin-binding proteins" |
| LCR | Líquido cefalorraquidiano |
| LOS | Lipooligossacarídeo |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| Mab | Anticorpo monoclonal |
| MLEE | "Multilocus Enzyme Electrophoresis" |
| MLST | "Multilocus Sequence Typing" |
| NBT | Cloreto de <i>p</i> -nitro azul tetrazólio |
| Opa | "Opacity associated protein" |
| Opc | "Opacity protein 5c" |
| PAGE | "Polyacrylamide gel electrophoresis" |
| PMEs | Proteínas de membrana externa |
| PorA | Porina A |

| | |
|----------|--------------------------------|
| PorB | Porina B |
| PSC | Polissacarídeo C |
| Rmp | "Reduction modifiable protein" |
| RP | Resposta primária |
| RS | Resposta secundária |
| SDS | "Sodium dodecyl sulphate" |
| Tbps | "Transferrin-binding proteins" |
| TD | Timo dependente |
| TI | Timo independente |
| TSA | "Tryptic Soy Agar" |
| TSB | "Tryptic Soy Broth" |
| Tris | Tris(hidroxilmetil)aminometano |
| TT | Toxóide tetânico |
| VMEs | Vesículas de membrana externa |
| VR | "Variable Region" |
| L | Litro |
| mL | mililitro |
| μ l | microlitro |
| M | Molar |
| mM | milimolar |
| μ M | micromolar |
| mg | miligrama |
| μ g | micrograma |
| ng | nanograma |
| μ m | micrômetro |
| nm | nanômetro |
| Da | Dalton |
| kDA | "kiloDalton" |
| mA | miliAmperes |
| <i>g</i> | Aceleração da gravidade |
| rpm | rotação por minuto |

1. INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis é um patógeno exclusivamente humano, de transmissão respiratória, sendo responsável por um amplo espectro de doenças como conjuntivite, pneumonia, pericardite, embora as formas clínicas mais comuns da Doença Meningocócica sejam a meningite e, em menor extensão, a septicemia denominada meningococemia (Steven e Wood, 1995).

Essa doença é extremamente relevante para a saúde pública, por sua tendência em causar surtos e epidemias e pela alta letalidade que, a despeito da existência de antibióticos eficazes, chega a atingir aproximadamente 10% na forma clínica de meningite (Poolman, 1995). A meningococemia é a expressão mais grave da doença, apresentando uma taxa de letalidade que varia entre 15-30% (Riedo et al., 1995) e um elevado índice (>25%) de seqüelas como surdez, retardo mental e amputações (Tzeng e Stephens, 2000; Rappuoli, 2001). O maior impacto da doença, em períodos não epidêmicos, reflete-se nas crianças, entre as quais a taxa de incidência e a proporção de casos fatais podem ser 20 vezes maiores que na população adulta. Em períodos epidêmicos, observa-se um deslocamento da faixa etária atingida, com aumento de número de casos em adolescentes e adultos (Tzeng e Stephens, 2000), provavelmente, devido à falta de imunidade das populações, frente à cepa epidêmica circulante (Morley e Pollard, 2002).

Neisseria meningitidis foi isolada do líquido cefalorraquidiano, pela primeira vez em 1887, por Wiechselbaum; apresenta-se como diplococo Gram-negativo, com parede celular composta por duas membranas separadas por uma camada de peptídeoglicano. A membrana externa é constituída por lipídeos, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas. A parede

celular é recoberta por uma cápsula polissacarídica que, associada a algumas estruturas da membrana externa, representam os principais imunógenos e fatores de virulência da bactéria (Poolman et al., 1995).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado a importância da cápsula na patogenicidade do meningococo. Como outros determinantes de virulência, a expressão estrutural da cápsula sofre variação de fase, sendo que os isolados da nasofaringe são em geral não encapsulados, o que facilita a adesão e invasão bacteriana nas células epiteliais (de Vries et al., 1996). A cápsula é o principal fator de sobrevivência do microrganismo na corrente circulatória, que o protege da lise mediada por complemento e da fagocitose por neutrófilos e monócitos (Klein et al., 1996). A maioria dos meningococos isolados de doença invasiva possui cápsula polissacarídica derivada do ácido siálico - ácido *N*-acetilneuramínico, exceto a do sorogrupo A que é composta de unidades repetidas de *N*-acetilmanosamina-1-fosfato (Tzeng e Stephens, 2000). Assim, os polissacarídeos dos sorogrupos B e C são homopolímeros do ácido siálico, sendo o do sorogrupo B composto por unidades repetidas do (α 2→8) ácido *N*-acetilneuramínico e o de C por unidades repetidas do (α 2→9) ácido *N*-acetilneuramínico (DeVoe, 1982).

As proteínas referidas como de membrana externa (PMEs) são divididas em classes designadas de 1 a 5, de acordo com a sensibilidade às enzimas proteolíticas, segundo o mapeamento de aminoácidos e seus pesos moleculares (Frasch, 1987). Entre essas proteínas, destacam-se: a porina PorA ou proteína de classe 1 atuante no transporte seletivo de cátions, com 44-47 kDa e as porinas PorB que compreendem as de classe 2 ou 3 atuantes no transporte seletivo de ânions, apresentando 37-42 kDa (van der Ley et al., 1991). A proteína de classe 4, denominada Rmp, é altamente conservada entre as cepas de meningococo e possui 37-42 kDa; sua função biológica ainda hoje é desconhecida (Frasch et al., 1985, 1986; Rosenstein et al., 2001). As proteínas de classe 5, Opa com 26-30 kDa e Opc de 25 kDa

são relacionadas à aderência e à invasão das células epiteliais não ciliadas da mucosa da nasofaringe (de Vries et al., 1996, 1998). *In vitro*, os meningococos podem expressar de quatro a cinco proteínas Opa diferentes, assim como não expressá-las; no entanto, a extensão dessa variação, *in vivo*, não é conhecida. A proteína Opc não apresenta esta diversidade antigênica, mas sofre variação de fase, com alta frequência, sendo comum a não expressão dessa proteína em cepas isoladas de doença invasiva (Achtman et al., 1991).

Linhagens de meningococos apresentam *pili*, apêndices filamentosos compostos por proteínas glicosiladas, ancorados na membrana externa; essas estruturas atravessam a cápsula ligam-se a receptores nas células epiteliais não ciliadas da mucosa da nasofaringe, promovendo a primeira etapa de um processo complexo de interações da bactéria com as células do hospedeiro (Stephens e Farley, 1991; Griffiss, 1995; Kallstrom et al., 1997).

Após essa primeira ligação, inicia-se um processo mais íntimo de adesão e invasão do epitélio, mediado pela associação das proteínas de classe 5, Opa e Opc, com receptores nas células e fagócitos; há endocitose do meningococo e subsequente passagem, via vacúolos (McGee et al., 1983; Stephens et al., 1983), atingindo o tecido subepitelial. Ocorre, portanto, vínculo equilibrado entre a bactéria e o sistema imune, evento que, em geral, promove a imunização natural (Poolman, 1995).

Vários fatores relacionados ao hospedeiro e à bactéria podem levar à quebra desse equilíbrio, ocasionando a invasão da corrente circulatória pela bactéria, onde sobrevivência e multiplicação dependerão de sua capacidade de escapar dos mecanismos de defesa.

Outros componentes expostos na superfície do meningococo desempenham funções importantes na sua patogenicidade, como o LPS, e algumas proteínas que se expressam em condições de escassez de íons de ferro livre (Fe^{+++}).

O LPS do meningococo é formado por uma molécula de lipídeo A e por uma cadeia de polissacarídeo, representada por um número pequeno de unidades repetitivas, sendo referido como lipooligossacarídeo (LOS). A unidade polissacarídica é constituída de moléculas de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-octonato (KDO), heptoses e cadeia de polissacarídeo que apresenta grande variabilidade em extensão e composição, o que permite classificar o meningococo em 12 imunotipos designados pela letra L (L1 a L12) (Scholten et al., 1994).

Preparações obtidas a partir de cultivo *in vitro* apresentam variabilidades na expressão do LOS, havendo evidências de que estas variações também ocorram *in vivo* (Meyer et al., 1994). A maioria dos isolados de nasofaringe é acapsulada e expressa LOS não sialilado como L1 e L8 (Broome, 1986; Poolman et al., 1995). Cepas de meningococo que possuem em sua estrutura de LOS a molécula de lacto-*N*-neotetraose podem, através da ação catalizadora da enzima sialiltransferase, utilizar o ácido siálico endógeno para sialilar essa molécula; dessa forma há expressão de tipos mais complexos de LOS como L3, L7 e L9, freqüentes em bactérias isoladas de doença invasiva (Jones et al., 1992).

Fenótipos de LOS com baixa sialilação, como o L8, predominam na fase inicial da infecção, pois favorecem a entrada da bactéria nas células da mucosa, entretanto são mais susceptíveis à atividade bactericida mediada pelo complemento (Moran et al., 1994). Em contraste, cepas com LOS altamente sialilados, como L3, L7 e L9, são incapazes de penetrar nas células epiteliais, mas resistem à morte por anticorpos e complemento (Estabrook et al., 1997).

As cepas de meningococo podem ainda expressar mais que um imunotipo e, sob pressão das defesas do hospedeiro, sofrer mudanças genéticas deixando de expressar determinado imunotipo (Jennings et al., 1999).

A síndrome inflamatória observada na meningococcemia, incluindo coagulação intravascular, fibrinólise, ativação do complemento, assim como a produção de diferentes citocinas, é desencadeada pela endotoxina (LOS) do meningococo (Brandtzaeg, 1995).

Durante a multiplicação e lise de bactérias, *in vitro*, ocorre liberação de vesículas de membrana externa (VMEs) que são compostas de proteínas, lipídeos, polissacarídeo capsular e grande quantidade de LOS (25 a 50% em relação às proteínas) (DeVoe e Gilchrist, 1973). Stephens et al. (1982) e Brandtzaeg et al. (1989, 1992) observaram estas estruturas também no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com Doença Meningocócica e correlacionaram níveis altos de LOS com a severidade da doença.

Durante a infecção, o meningococo encontra um ambiente restrito de ferro livre, pois a maioria desses cátions no organismo encontra-se intracelularmente complexado à hemoglobina e extracelularmente à transferrina e lactoferrina. Sendo o ferro essencial para a sobrevivência, a bactéria torna-se hábil em adquirí-lo expressando, na sua superfície, receptores que se ligam a estas proteínas e, com auxílio de sistemas de transporte, internalizam o ferro necessário.

Mecanismos distintos de captação do Fe^{+++} têm sido relatados: a proteína de membrana externa HmbR liga-se à hemoglobina (Stojiljkovic et al., 1996), as proteínas designadas Tbps e Lbps ligam-se à transferrina e à lactoferrina, respectivamente, (Genco e Desai, 1996) sendo que essa última desempenha papel importante no estágio inicial da invasão, quando a lactoferrina é a principal fonte de Fe^{+++} disponível nas superfícies da mucosa da nasofaringe. Outro sistema importante, denominado HpuA e HpuB, é responsável pela captação do ferro complexado à hemoglobina-haptoglobina, que parece ser a principal forma de hemoglobina durante a bacteriemia (Genco e Desai, 1996).

Todas as cepas patogênicas de meningococo secretam uma exoenzima, a IgA1 protease que cliva a imunoglobulina IgA interferindo nas funções protetoras desse isotipo na mucosa. Além disso, os fragmentos Fab_α da IgA1 liberados pela clivagem, retêm a capacidade de ligar-se ao antígeno podendo bloquear o acesso de anticorpos IgG e IgM (Mulks e Plaut, 1978; Jarvis e Griffiss, 1991). Outra função biológica dessa enzima recentemente descrita refere-se à clivagem da LAMP1, uma glicoproteína presente na membrana dos lisossomos, onde se processa a degradação de material endocitado pelas células. A função da LAMP1 é desconhecida, mas acredita-se que proteja a membrana dos lisossomos da digestão por hidrolases; sua clivagem teria um efeito negativo na função dos lisossomos, favorecendo a sobrevivência da bactéria dentro das células epiteliais (Ayala et al., 1998).

Os antígenos de superfície de *Neisseria meningitidis* são altamente variáveis, o que facilita a colonização e evasão das defesas do hospedeiro. Essa diversidade tem sido utilizada no desenvolvimento de sistemas de classificação.

Baseado nas diferenças imunoquímicas de seus polissacarídeos capsulares, os meningococos são classificados em 12 sorogrupos distintos, a saber: A, B, C, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, e Z (Morley e Pollard, 2002) sendo que os sorogrupos A, B, C, W135 e Y são responsáveis pela maioria dos casos de Doença Meningocócica (Peltola, 1984; Pollard e Frasch, 2001).

Os meningococos podem ainda ser classificados em sorotipos e soro-subtipos de acordo com a diversidade antigênica das proteínas PorB e PorA, respectivamente. Atualmente são descritos na literatura 18 sorotipos e 18 soro-subtipos (Sacchi et al., 1998a, 1998b).

Segundo modelo topológico proposto por van der Ley et al. (1991) para as porinas da *Neisseria*, a proteína PorA apresenta duas regiões variáveis VR1 e VR2 localizadas no topo das alças 1 e 4 expostas na superfície bacteriana e, responsáveis pela diversidade antigênica da proteína.

Já as proteínas PorB apresentam quatro regiões variáveis: VR1, VR2, VR3 e VR4, localizadas no topo das alças 1, 5, 6 e 7, respectivamente determinando os epítomos de sorotipo (Feavers et al., 1992; Zapata et al., 1992).

Os meningococos podem também ser classificados de acordo com as variações antigênicas das proteínas de classe 5, Opa. Entretanto, não existe uma nomenclatura internacionalmente reconhecida para classificação dessa proteína.

A partir da composição da cadeia polissacarídica do LOS, podem ainda ser caracterizados em imunotipos, conforme mencionado anteriormente.

Desta forma, a caracterização de uma cepa de *Neisseria meningitidis* como [B:4,7:P1.19,15:5,7:L3] corresponde à classificação em sorogrupo (B), sorotipo (4,7), subtipo (P1.19,15), classe 5 (5,7) e imunotipo (L3).

A grande variação dos componentes de superfície bacteriana tem levado mais recentemente ao desenvolvimento de novos métodos de classificação, tendo por referência, características menos sujeitas às pressões seletivas, como algumas enzimas citoplasmáticas essenciais. Através do estudo do perfil da motilidade eletroforética destas enzimas (MLEE), os meningococos são classificados em tipos eletroforéticos - ETs - e agrupados em complexos ou grupos clonais, cujos membros descenderiam de uma única célula ancestral que teria sofrido mudanças

genéticas mínimas no decurso de tempo (Caugant et al., 1987). A técnica de seqüenciamento dos genes que codificam essas enzimas, denominada MLST, também tem sido empregada para agrupar cepas em grupos clonais (Maiden et al., 1998). O estudo das populações clonais do meningococo é de grande valia, tanto para o entendimento da epidemiologia global da Doença Meningocócica, como para o desenvolvimento de vacinas. Entre os isolados de doença endêmica podem ser detectados diversos grupos genéticos, enquanto que a maioria dos isolados de surtos ou epidemias se restringem a poucos grupos genéticos (Achtman, 1995). Assim, por exemplo, o clone ET-5 que inclui predominantemente cepas do sorogrupo B tem causado surtos no Brasil, Cuba, Chile, Noruega e Estados Unidos (Morley e Pollard, 2002). Linhagens do sorogrupo C clone ET-37 têm causado epidemias nos continentes europeu, americano e africano (Morley e Pollard, 2002). Bactérias do sorogrupo A, subgrupo III foram responsáveis por pandemias na década de 70, tendo atingido China, Rússia, Noruega, Finlândia e Brasil (Achtman, 1995) e, mais recentemente, a África (Tikhomirov et al., 1997).

A Doença Meningocócica ocorre de forma endêmica no mundo, sendo que, em países desenvolvidos, os sorogrupos B e C são responsáveis pela maioria dos casos, apresentando coeficientes de incidência que variam de 1 a 3 por 100.000 habitantes/ano, e atingindo coeficientes de 10 a 50 casos por 100 mil habitantes/ano, durante surtos e epidemias (Bash et al., 1995).

Neisseria meningitidis sorogrupo A predomina na África e na Ásia tanto em períodos endêmicos como epidêmicos, com coeficientes de incidência que variam entre 10-20/100.000 habitantes/ano, nos períodos interepidêmicos (Tikhomirov et al., 1997). Em alguns países da zona do sub-Saara, no chamado "cinturão da meningite", a Doença Meningocócica causada pelo sorogrupo A apresenta padrões cíclicos, ocorrendo epidemias a cada 5-10 anos, e com coeficientes de incidência que podem atingir

valores como 500-1000 por 100.000 habitantes/ano, durante os picos epidêmicos (Tikhomirov et al., 1997; Morley e Pollard, 2002).

No Brasil, uma epidemia explosiva ocorreu no início da década de 70, alcançando seu pico máximo em 1974, quando a taxa de incidência chegou a 179,4 por 100 mil habitantes. Inicialmente houve um predomínio de bactérias do sorogrupo C que, em seguida foi sucedido pelo sorogrupo A. Contudo, ao longo da década de 80, o sorogrupo B passou a ser o mais freqüente em várias regiões do Brasil e, a partir de 1986, a incidência de doença causada por esse sorogrupo começou a ultrapassar os níveis endêmicos nas regiões Sul e Sudeste, até atingir, nos anos 90, os coeficientes médios de 5 por 100.000 habitantes/ano (Evolução, 1999; Requejo, 1999).

Atualmente, a doença no Brasil vem sendo causada por meningococo B e C representando cerca de 60% e 40% dos casos, respectivamente, sendo que o clone do sorogrupo B, predominante desde 1986, é o [B:4,7:P1.19,15] (Sacchi et al., 1998c, 2001).

Os estudos relativos à natureza da imunidade ao meningococo têm sido documentados desde o primeiro isolamento do microrganismo em 1887. Atualmente, há fortes evidências de que, para os sorogrupos A, B e C, um dos mecanismos principais de proteção inclui a lise bacteriana por anticorpos bactericidas, mediada pelo sistema complemento (Pollard et al., 1999).

As comprovações sobre a participação dos anticorpos na proteção vieram de estudos iniciais de Goldschneider e colaboradores na década de 60.

Num primeiro estudo (Goldschneider et al., 1969a), comparou-se curva de incidência da doença por idade, com a presença de anticorpos bactericidas antimeningocócicos A, B e C (títulos ≥ 4) nos soros da população geral. Constatou-se que a incidência da doença relacionada à idade foi inversamente proporcional à prevalência de títulos de anticorpos

bactericidas específicos para os sorogrupos A, B e C. A doença é rara no primeiro mês de vida, onde 50% dos soros dos recém-nascidos apresentam atividade bactericida por transferência de anticorpos maternos. Estas crianças tornam-se susceptíveis, quando esses anticorpos desaparecem da circulação; assim, entre 6 meses e 1 ano de idade verifica-se a maior susceptibilidade à Doença Meningocócica. A prevalência de títulos de anticorpos bactericidas começa a aumentar progressivamente durante o período da infância até a idade adulta, quando 65-85% dos soros dos indivíduos apresentam títulos de anticorpos bactericida ≥ 4 contra *Neisseria meningitidis* e menor incidência da doença.

Os estados de imunidade natural desenvolvem-se, provavelmente, a partir de contatos repetidos e intermitentes com o próprio meningococo e/ou com *Neisserias* não patogênicas como ocorre com a *Neisseria lactamica* que, freqüentemente, coloniza a nasofaringe de crianças (Gold et al., 1978). Há evidências ainda, de que algumas bactérias entéricas contribuam para essa imunidade, por induzirem anticorpos que reagem cruzadamente com o meningococo, como é o caso das espécies *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli* K1 e *Escherichia coli* K92 que se relacionam antigenicamente com os meningococos dos sorogrupos A (Vann et al., 1976), B (Kasper et al., 1973) e C (Globe et al., 1977), respectivamente.

Com a finalidade de comprovar se a susceptibilidade à Doença Meningocócica relacionava-se com uma deficiência de anticorpos séricos bactericidas, conforme sugerido no primeiro estudo descrito acima, Goldschneider e colaboradores (1969a) iniciaram uma análise prospectiva entre recrutas americanos recém-chegados em uma base militar.

Por ocasião da admissão dos soldados, foram colhidos soros definidos como soros de linha básica. A incidência da doença entre os recrutas foi monitorada durante sua permanência na base militar e correlacionada com os níveis de anticorpos bactericidas. Verificou-se que os

soros dos recrutas que adoeceram eram destituídos de anticorpos contra as respectivas cepas infectantes.

Estudos de Scherp e Rake (1945), Kabat et al. (1945), Watson e Scherp (1958) e Goldschneider et al. (1969b) demonstraram que grande parte dos anticorpos bactericidas presentes nos soros hiper-ímmunes de várias espécies de animais e no soro humano de convalescentes era dirigida contra o polissacarídeo capsular específico.

O sistema complemento também desempenha função importante na proteção à doença, o que tem sido demonstrado através de estudos envolvendo pacientes com deficiência em proteínas do complemento. Deficiência em C3 ou nas frações terminais C5 a C9 leva a uma maior susceptibilidade a infecções meningocócicas e comumente a episódios repetidos (Mold, 1999).

O conhecimento da importância dos anticorpos bactericidas específicos para cápsulas na indução da proteção à Doença Meningocócica serviu de base para o desenvolvimento das vacinas polissacarídicas e, atualmente, existem quatro tipos de vacinas baseadas em polissacarídeos capsulares purificados: A, C, A+C, e a tetravalente A+C+W135+Y (Peltola, 1999). Embora imunogênicas, estas possuem eficácia limitada, não só pela curta duração da resposta imune induzida - não mais que três anos mesmo em adultos (Ala'Aldeen, 1996), bem como pela ausência de proteção em crianças menores que 3 meses de idade, para a vacina polissacarídica A e em crianças menores de 2 anos, para a polissacarídica C (Frasch, 1995).

A ausência de memória imunológica e a impossibilidade de gerar anticorpos bactericidas em crianças são características das vacinas polissacarídicas; tais fatos podem ser explicados pela propriedade timo-independente (TI) dos antígenos polissacarídicos (Poolman, 1995), capazes de se ligarem diretamente aos linfócitos B induzindo a síntese de anticorpos na ausência de células T-auxiliares. Como conseqüência, não há formação de células de memória, sendo que os anticorpos produzidos são de baixa

afinidade e de curta duração, com prevalência da produção de isotipos IgM. Ainda mais, a resposta imune induzida pelos antígenos TI é idade-dependente, sendo pobre tanto em crianças abaixo de 2 anos, como em idosos (Goldblatt, 1998).

Por essas limitações, as vacinas polissacarídicas C são recomendadas apenas no controle de surtos e epidemias e para proteger grupos de alto risco de infecção, por períodos curtos de tempo. Crianças devem ser vacinadas somente a partir de 2 anos de idade. Em situações de risco persistente, indica-se para adultos uma revacinação três a cinco anos após a dose inicial. Para crianças que tenham sido imunizadas com idade inferior a 4 anos, preconiza-se revacinação, entre dois a três anos, após a dose inicial (Recommendations, 2000).

Por seu turno, as vacinas polissacarídicas A são recomendadas para todas as faixas etárias, em períodos epidêmicos, incluindo crianças, a partir de 3 meses de idade, para as quais se recomenda uma segunda dose, cerca de três meses mais tarde e doses de reforço, aos 18 meses e aos 5 anos de idade (Begg, 1995).

Restrições às vacinas polissacarídicas procedem de estudos recentes demonstrando que doses repetidas de vacinas polissacarídicas A ou C podem induzir tolerância imunológica tanto em crianças, como em adultos (Granoff et al., 1998; MacDonald et al., 1998; MacLennan et al., 1999; Borrow et al., 2001a).

O declínio da meningite por *Haemophilus influenzae* b em crianças menores de 5 anos de idade nos países que introduziram a vacina Hib-OMP conjugada, incentivou o desenvolvimento de vacinas meningocócicas, aplicando-se o princípio de conjugação de antígenos TI com proteínas carregadoras, convertendo o polissacarídeo em antígeno T-dependente (TD). Vacinas constituídas de polissacarídeos C conjugados com toxóide

tetânico (TT) ou diftérico (CRM₁₉₇) foram produzidas e submetidas a estudos de eficácia clínica. (Twumasi et al., 1995; MacDonald et al., 1998; Richmond et al., 2000).

Na Inglaterra, a vacina PSC-CRM₁₉₇ foi introduzida no esquema de vacinação infantil em 1999, sendo administrada aos 2, 3 e 4 meses de idade. Concomitantemente, realizou-se uma campanha de imunização incluindo toda população abaixo de 18 anos. Os dados mostraram um declínio acentuado da incidência da Doença Meningocócica causada pelo sorogrupo C em todos os grupos etários vacinados. A eficácia estimada da vacina foi de 97% no grupo de 15-17 anos e de 92% em crianças de 2-3 anos de idade (Ramsay et al., 2001).

Diferentemente dos demais antígenos capsulares, o polissacarídeo do sorogrupo B do meningococo, um homopolímero do ácido siálico: (α 2→8) ácido *N*-acetilneuramínico possui uma baixa imunogenicidade, provavelmente pela identidade estrutural entre sua molécula e as glicoproteínas polissialiladas do tecido cerebral humano; esta similaridade inviabiliza a utilização de vacinas polissacarídicas contra o meningococo do sorogrupo B (Ala'Aldeen e Cartwright, 1996).

Com o objetivo de induzir anticorpos, que reconheçam epítomos do antígeno capsular mas não os do hospedeiro, têm sido desenvolvidas vacinas compostas de polissacarídeo B quimicamente modificado e conjugado com diferentes proteínas carregadoras como TT, CRM₁₉₇ ou PorB recombinante (Jennings et al., 1986; Bartoloni et al, 1995; Fusco et al., 1997). A possibilidade de indução de anticorpos que reconheçam o ácido siálico presente nas glicoproteínas humanas, portanto com potencial de provocarem doença auto-imune, faz com que essas vacinas sejam vistas com bastante cautela.

Frente às dificuldades de se utilizar o polissacarídeo B como antígeno vacinal, diferentes antígenos subcapsulares têm sido pesquisados.

Numerosos estudos têm demonstrado que os anticorpos bactericidas induzidos pela imunização ou após doença causada pelo meningococo sorogrupo B são dirigidos contra as proteínas de classe 1, 2 ou 3 e 5 encontradas na membrana externa (Mandrell e Zollinger, 1989; Boslego et al., 1995; Rosenqvist et al., 1995; Milagres et al., 1998; Wedege et al. 1998; Milagres et al., 2000). Anticorpos opsonizantes parecem ser outro mecanismo de defesa importante contra o meningococo, particularmente, os do sorogrupo B (Ross et al., 1987; Halstensen et al, 1989). Conforme demonstrado em soros de pacientes convalescentes e em soros de indivíduos vacinados com vacinas de VMEs de meningococo sorogrupo B (Delvig et al, 1997; Lehmann et al., 1999), as porinas PorA e PorB, mas especialmente a PorB, são indutoras de anticorpos opsonizantes. Assim, essas proteínas são vistas como antígenos vacinais importantes.

O LOS é outro antígeno de interesse para a composição vacinal, pois a maioria dos soros de convalescentes de Doença Meningocócica ou de vacinados apresenta anticorpos específicos contra esse antígeno (Rosenqvist et al., 1995; Wedege et al., 1998).

As proteínas TbpA e TbpB também têm sido extensamente avaliadas: trabalhos recentes sugerem que TbpA é mais imunogênica que TbpB; estudos de proteção em modelos animais, empregando vacinas TbpA e TbpB recombinantes, demonstraram que a primeira é mais eficaz em proteger camundongos contra as cepas bacterianas desafiantes (West et al., 2001).

O seqüenciamento do genoma da cepa de meningococo B, designada MC58, aporta outras perspectivas para o desenvolvimento de vacina antimeningocócica B (Pizza et al., 2000; Tettelin et al., 2000). Sete proteínas recombinantes foram selecionadas, para maiores investigações, por serem : expressas na superfície da bactéria, apresentarem-se altamente

conservadas entre 31 cepas de meningococo dos cinco sorogrupos principais do meningococo e por induzirem anticorpos bactericidas contra a cepa homóloga. Duas destas proteínas induziram a produção de anticorpos também contra cepa heteróloga do sorogrupo B. Os resultados obtidos são muito promissores, portanto, pesquisas adicionais utilizando combinações destes antígenos ou associações com diferentes adjuvantes estão sendo realizadas visando ampliar a proteção através da modulação da imunidade.

A complexidade da resposta imunológica desenvolvida após doença causada pelo sorogrupo B sugere que uma vacina eficaz deva conter múltiplos determinantes antigênicos de modo a induzir resposta protetora de especificidade variada. Esse princípio levou ao desenvolvimento de vacinas baseadas em VMEs. Dentre as vacinas mais extensamente avaliadas estão a VA-MENGOC-BC[®], fabricada em Cuba, composta de VMEs de meningococo do clone epidêmico [B:4:P1.19,15:L3,7,9] enriquecida com um complexo de proteínas de alto peso molecular e polissacarídeo C e adsorvidos ao Al(OH)₃, e a vacina Folkehelsa[®] produzida na Noruega, composta de VMEs de meningococo do clone epidêmico [B:15:P1.7,16:L3,7,9] adsorvida ao Al(OH)₃ (Romero e Outschoor, 1994).

Estas vacinas têm sido avaliadas em ensaios clínicos envolvendo um grande número de adultos e crianças em vários países, mostrando-se seguras quanto à reatogenicidade e eficazes quanto à indução de anticorpos bactericidas. Nos estudos clínicos realizados na Noruega (Bjune et al., 1991), em Cuba (Sierra et al., 1991) e no Brasil (de Moraes et al., 1992), através de esquemas de imunização utilizando duas doses, foram detectadas algumas limitações na eficácia protetora dessas vacinas. Há evidências de que a proteção induzida foi de curta duração, devido ao aumento da incidência da doença observado entre vacinados na Noruega, um ano após a imunização (Bjune et al., 1991). Em estudos desenvolvidos no Brasil, observou-se indução de produção de níveis baixos de anticorpos

bactericidas em crianças na faixa etária inferior a 4 anos (Milagres et al., 1994), corroborando os resultados obtidos em um estudo de caso controle, onde se verificou que a eficácia vacinal estimada foi idade-dependente (de Moraes et al., 1992). Outra limitação importante observada nesses estudos foi que as vacinas induziram anticorpos bactericidas soro-subtipo específicos (Romero e Outschoor, 1994).

Resultados mais promissores foram obtidos no Chile, comparando-se as vacinas cubana e norueguesa. As avaliações foram feitas em três grupos etários distintos compreendendo: crianças menores de 1 ano; crianças entre 2 e 4 anos; adultos entre 17 e 30 anos. Utilizou-se o esquema de imunização de três doses, administradas com intervalo de dois meses (Tappero et al., 1999).

Os soros obtidos após a segunda e a terceira doses foram testados segundo a atividade bactericida frente às duas cepas vacinais, e frente à linhagem epidêmica chilena [B:15:P1.7^h,3:L3,7,9]. Os níveis de anticorpos bactericidas induzidos contra as cepas homólogas foram mais elevados, após a terceira dose, em todos grupos etários, do que os induzidos, após duas doses.

Ambas as vacinas induziram, em crianças de 2 a 4 anos e em adultos, anticorpos bactericidas que reagiram cruzadamente com as cepas vacinais heterólogas e com a linhagem chilena, embora a porcentagem de respondedores tenha sido maior em adultos. Entretanto, em crianças menores de 1 ano de idade, cujos soros apresentaram atividade bactericida contra as cepas vacinais homólogas, não se observaram anticorpos bactericidas contra cepas soro-subtipo heterólogas. Esses resultados indicam que a proteína de classe 1 representou o antígeno vacinal principal nessa faixa etária. Os antígenos responsáveis pela indução da atividade bactericida heteróloga observada, tanto em crianças mais velhas quanto em adultos, não foram identificados, mas podem ter incluído imunotipos ou

proteínas Opa e Opc comuns entre as cepas ou outros antígenos, indutores potenciais de atividade bactericida dependente da idade.

Com o objetivo de melhorar a cobertura protetora das vacinas VMEs contra meningococo sorogrupo B, pesquisadores holandeses desenvolveram uma vacina hexavalente contendo VMEs de duas cepas de meningococo manipuladas geneticamente (van der Ley et al., 1995; Claassen et al., 1996). Cada cepa passou a expressar três proteínas de classe 1 de diferentes soro-subtipos. A vacina foi testada em adultos e crianças mostrando-se segura e capaz de induzir anticorpos bactericidas em todos os grupos etários (Peeters et al., 1996; Cartwright et al., 1999; Kleijn et al., 2000). Ensaios clínicos, em grupos de crianças menores de 1 ano, entre 2 a 3 anos e entre 7 a 8 anos de idade, demonstraram a boa imunogenicidade da vacina, após esquema empregando três doses e uma de reforço. Entretanto, o aumento de títulos bactericidas de, no mínimo, quatro vezes em relação aos títulos pré-vacinais foi soro-subtipo-dependente. Assim, os títulos mais baixos e a menor porcentagem de indivíduos apresentando soroconversão foram observados contra a cepa expressando PorA do soro-subtipo [P1.7^h,4], que possui homologia com cepas subtipo [P1.4] prevalentes na Holanda (Kleijn et al., 2000). Com o intuito de esclarecer esses resultados, desenvolveu-se uma vacina monovalente baseada em VMEs de cepa geneticamente alterada para expressar apenas a proteína de classe 1 de soro-subtipo [P1.7^h,4]. Essa foi avaliada em crianças com 2 a 3 anos de idade e apresentou-se mais imunogênica do que a vacina hexavalente contra cepas soro-subtipo homólogas, sugerindo a interferência na imunogenicidade das proteínas nas vacinas contendo múltiplos antígenos de classe 1 (Kleijn et al., 2001).

Apesar da diversidade antigênica da proteína de classe 1, níveis hiper-endêmicos e epidêmicos causados pelo meningococo sorogrupo B tendem a ser clonais, estabelecem-se lentamente em uma região, permanecendo por longos períodos. Assim, uma vacina dirigida contra um

ou dois soro-subtipos poderia promover ampla cobertura em uma determinada área e período (Frasch et al., 2001).

O desenvolvimento de tecnologias de vacinas de VMEs, prevendo a possibilidade de inclusão ou exclusão de antígenos vacinais, conforme a situação epidemiológica da Doença Meningocócica causada pelo sorogrupo B, a exemplo do que se passa com a vacina contra vírus da influenza, parece ser uma alternativa viável para o controle de surtos e epidemias localizadas. Novas estratégias têm sido desenvolvidas, visando o aprimoramento dessas vacinas, como a utilização de adjuvantes distintos, o emprego de antígenos conservados indutores de anticorpos bactericidas e a implantação de esquemas de imunização variados.

No Brasil, através de um projeto multistitucional, envolvendo os Institutos Adolfo Lutz e Butantan de São Paulo e Fundação Oswaldo Cruz/Bio-Manguinhos do Rio de Janeiro, está em desenvolvimento uma vacina estruturada em proteínas da VME de meningococo B da cepa [B:4,7:P1.19,15], clone representativo da epidemia ocorrida na década de 80 e que ainda prevalece entre o sorogrupo B no Brasil. A vacina produzida experimentalmente mostrou-se imunogênica em modelo animal, induzindo altos níveis de anticorpos bactericidas, após duas doses vacinais administradas com intervalo de um mês. A análise da especificidade da resposta produzida, pela técnica de "Immunoblot", revelou a presença de anticorpos da classe IgG dirigidos, principalmente, contra as proteínas PorA, PorB, Rmp e Opa (Milagres et al., 1996).

Esquemas de imunização, empregando-se duas e três doses, têm sido freqüentemente avaliados em ensaios clínicos, tornando evidente a importância da terceira dose na resposta imune.

Kleijn et al. (2001) avaliando a imunogenicidade da vacina monovalente holandesa [P1.7^h,4], em crianças de 2 a 3 anos de idade, comparou esquemas de imunização de duas doses e um reforço, e três

doses e um reforço. O intervalo médio entre as injeções foi de 44 dias no esquema de duas doses e, de 29 dias no esquema de três doses; entre a última dose e o reforço foi de seis meses em ambos esquemas. Nesse estudo demonstrou-se que, no segundo protocolo, houve indução de maiores títulos de anticorpos somente após a dose reforço, não havendo diferenças nos níveis médios de anticorpos bactericidas após duas (8,72 X 7,82) e três (7,66) doses. As porcentagens de crianças que apresentaram aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos bactericidas, em relação aos títulos pré-vacinais, foram semelhantes nos dois esquemas: 81% e 96% após duas doses e reforço, respectivamente; 78% e 100% após três doses e reforço, respectivamente.

Estes estudos sugerem que as determinações sobre a eficácia dos esquemas de vacinação na indução de respostas protetoras necessitam de estudos mais abrangentes, incluindo aspectos como a influência do intervalo de tempo entre doses vacinais na resposta imunológica e avaliações em diferentes populações.

A defesa do hospedeiro contra infecções, toxinas, bem como a indução de proteção através de vacinas, dependem de mecanismos específicos e não específicos, em sua grande maioria, determinados geneticamente. Outros fatores relevantes são a estrutura química e o estado físico dos antígenos constitutivos de imunógenos e patógenos. Os aspectos operacionais do sistema imune são também afetados por fatores ambientais, em especial as experiências prévias dos indivíduos com antígenos relacionados aos microrganismos ou administrados pelas vacinações.

Assim, numa população geneticamente heterogênea, grupos de indivíduos submetidos ao mesmo estímulo imunogênico, apresentarão distintas respostas inflamatórias e imunoadaptativas.

Essa variabilidade dependerá dos diferentes genótipos existentes na população, bem como dos ambientes pré e pós-natal aos quais, cada indivíduo vier a ser exposto (Mouton et al., 1988). Todo o processo evolutivo

relaciona-se à diversidade, essencial à sobrevivência da espécie e, nesse prisma, duas peculiaridades genéticas desempenham papel crucial: polimorfismo e poligenia.

Dentre os caracteres polimórficos tem-se a participação de genes dos loci de histocompatibilidade (Complexo Principal de Histocompatibilidade), os das regiões variáveis das imunoglobulinas (V Ig) e aqueles do sistema complemento (C). Por outro lado, as principais características efetoras do sistema imune, como atividade macrofágica/resposta inflamatória, linfócitos B/resposta de anticorpos, receptores T/imunidade mediada por células, acham-se sob controle poligênico e, apesar de suas funções integradas, apresentam segregações independentes (Biozzi et al., 1979; Sant'Anna et al., 1994). Assim, a tríade: diversidade, especificidade e complexidade são expressões fundamentais dos eventos imunobiológicos que garantem a proteção multidirecional de uma população natural. Na quase totalidade dos processos de imunização e de resistência a patógenos e toxinas, observa-se, nas populações, distribuições contínuas de fenótipos de resistência natural ou adquirida a diferentes infecções.

Quanto aos patógenos, para as mais distintas características, como expressões antigênicas diversas, infectividade e virulência, há uma gama de variações que incluem, também, a diversidade genética constitutiva de uma dada espécie e influências de fatores ambientais múltiplos.

Os estudos em modelo animal têm colaborado na elucidação de inúmeros aspectos da resposta imune. A abordagem mais freqüente envolve a utilização de linhagens de camundongos isogênicos, resultantes de cruzamentos consangüíneos. Assim, essas linhagens representam indivíduos e, em geral, passam a expressar genes recessivos defectivos para diferentes fenótipos, sendo que as relações entre características imunes inatas e adaptativas não representam, necessariamente, fenômenos naturais. Esses animais expõem variações descontínuas, portanto

qualitativas, em nível de respostas inflamatórias e humorais, ou mediadas por células, a um único ou a poucos epítomos. Quando avaliados frente a imunógenos naturais, os camundongos isogênicos expressam respostas que se localizam nas classes modais de distribuições normais de freqüências de diferentes fenótipos. Nesse modelo, as variâncias intralinhagens observadas são exclusivamente devidas a fatores ambientais.

Os estudos dos genes que controlam caracteres quantitativos têm sido possíveis através da produção de linhagens de camundongos apresentando fenótipos extremos ("High" e "Low") para diferentes características imunobiológicas como, produção de anticorpos, resposta inflamatória e tolerância (Biozzi et al., 1979; Ibañez et al., 1992; da Silva et al., 1998). As linhagens boas e más produtoras de anticorpos foram obtidas por seleções genéticas bidirecionais, a partir de populações de camundongos geneticamente heterogêneos ("Swiss"), excluindo-se ou evitando-se consangüinidade (Biozzi et al., 1979). Assim, cinco seleções independentes foram obtidas, designadas Seleções I a V, tendo como caráter fenotípico selecionador a produção máxima e mínima de anticorpos em resposta aos diferentes antígenos escolhidos para a seleção.

As linhagens de camundongos "High" e "Low" da Seleção III empregadas no presente estudo, foram obtidas através de cruzamentos seletivos, em gerações consecutivas, de bons e maus produtores de aglutininas, em resposta ao antígeno flagelar de *Salmonella typhimurium*. As linhagens divergiram progressivamente na resposta de anticorpos até a geração F₁₆, quando então foi atingido um limite máximo e constante de separação (Siqueira et al., 1976).

A vantagem do emprego destes modelos animais reside no fato de dispor-se de linhagens portando alelos responsáveis pelas características opostas de alta e baixa produção de anticorpos, por conseguinte geneticamente homogêneas quanto aos loci relevantes que regulam o caráter selecionado, além de possibilitar, através de cruzamentos

interlinhagens, a reconstituição de população segregante F_2 apresentando distribuição normal dos fenótipos, tal qual populações naturais, geneticamente heterogêneas.

A partir de estudos de seleções genéticas de camundongos, bons ("High") e maus ("Low") produtores de anticorpos contra antígenos naturais complexos, demonstrou-se que a síntese quantitativa de anticorpos acha-se submetida à regulação poligênica, resultante do efeito aditivo de loci independentes. Quando testados frente a outros antígenos não relacionados aos antígenos usados durante os processos seletivos, as linhagens "High" e "Low" mantiveram amplitudes distintas de respostas, indicando que a regulação poligênica é essencialmente multiespecífica, característica que possibilita o uso dessas linhagens em estudos de respostas a outros imunógenos (Biozzi et al., 1979). As diferenças quantitativas observadas na resposta de anticorpos totais estendem-se aos diferentes isotipos de Ig; as linhagens "High" e "Low" apresentam diferenças significativas em todas as classes e subclasses de imunoglobulinas, tanto em nível basal, como após imunizações (Sant'Anna et al., 1985, 1991).

Estudos comparativos empregando linhagens geneticamente selecionadas para boa ou má resposta de anticorpos, camundongos isogênicos e linhagens geneticamente heterogêneas, além de representarem abordagem não usual, podem contribuir para o conhecimento do fenômeno biológico geral da resposta a vacinas e aportar subsídios para o entendimento da resposta imune em populações humanas compostas de indivíduos apresentando características heterogêneas de produção de anticorpos.

2. OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a influência do intervalo de tempo entre doses na resposta imune humoral à vacina de VMEs de meningococo sorogrupo B em desenvolvimento no Brasil, em diferentes linhagens de camundongos: camundongos geneticamente selecionados, homozigotos para os loci envolvidos na produção quantitativa de anticorpos, camundongos isogênicos e animais geneticamente heterogêneos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Vacina experimental contra meningococo B

3.1.1 Extração das vesículas de membrana externa (VMEs)

A cepa usada para a extração das VMEs empregadas na formulação da vacina foi isolada, em 1989, de líquido cefalorraquidiano de paciente residente em São Paulo; apresenta o fenótipo [B:4,7:P1.19,15:P5.5,7:L1,3,7,8] e está depositada na coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz sob a designação de N44/89.

As VMEs foram extraídas, conforme protocolo abaixo descrito, no Laboratório de Meningites do Instituto Butantan, coordenado pela Dra. Rocilda Schenkman e o lote usado foi o IB 113 .

As bactérias foram cultivadas inicialmente em 60 L de meio de Catlin incompleto (sem ferro) (Catlin, 1973), por aproximadamente 14 horas, a 35°C em frequência de agitação de 250 rpm, utilizando-se Biorreator New Brunswick Mod. MPP-80. Após 14 horas foram acrescentados 20 L de Catlin sem ferro contendo 100 µM de desferal (Sigma®), com o objetivo de manter o meio isento de ferro, propiciando a indução de proteínas reguladas pelo ferro. O cultivo foi mantido por mais seis horas em agitação de 400 rpm e então inativado a 56°C por 30 minutos.

A massa bacteriana foi separada do sobrenadante por filtração tangencial em sistema Pellicon Cassete, empregando-se membrana de 0,45µm (Millipore – HVMP 000.05). Os 60 L de filtrado, contendo as VMEs, foram concentrados a um volume final de aproximadamente 800 mL por

ultrafiltração tangencial em sistema Pellicon Cassete com “cut-off” de 300.000 Da (Millipore – PTKM 000.05).

O concentrado foi incubado “overnight” em tampão Tris-HCl 0,1M e EDTA (ácido etileno-diaminotetracético) 0,2 mM, pH 7,8-8,0 contendo desoxicolato de sódio (DOC, Sigma[®]) a 0,3-0,4% (p/v) para remoção da endotoxina das vesículas e posteriormente ultracentrifugado a 100.000 x g e 15°C por três horas. O precipitado contendo as VMEs foi ressuspenso em água apirogênica esterilizada com 0,02% de timerosal (p/v). As VMEs foram mantidas a 4°C ao abrigo da luz.

3.1.2 Extração e destoxificação do LOS

O LOS foi extraído na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz a partir do sobrenadante da ultracentrifugação das VMEs resultantes da produção do lote IB 135 da cepa N44/89, realizada no Instituto Butantan. A metodologia usada foi extração com fenol, conforme descrito por Gu e Tsai (1991), seguida de purificação por filtração em gel (Sephacryl S-300 HR). As frações do LOS foram monitoradas pelo conteúdo de KDO e precipitadas com etanol 80% e NaCl 0,25M. As amostras foram então dissolvidas em água destilada, a seguir liofilizadas e conservadas a -20°C.

A destoxificação do LOS (dLOS) foi obtida por tratamento com NaOH 0,2N durante uma hora a 60°C. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e coloração pela prata foram realizadas conforme descrito por Gu e Tsai (1991) e revelaram a presença de duas bandas entre 2000 a 4000 Da. Análises químicas das amostras de dLOS demonstraram pequena contaminação por proteína e ácidos nucleicos ($\leq 1\%$). O conteúdo de endotoxina foi analisado em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, RJ, pelo método de *Limulus amoebocyte lysate* - LAL (Hochstein, 1985) e ensaio de pirogênio em coelhos (US Pharmacopeia, 1980) antes e após a destoxificação. O teste de LAL foi negativo nas amostras de dLOS mesmo quando analisadas em

concentrações 10 vezes superior em relação ao LOS. O ensaio pirogênico também foi satisfatório já que o dLOS induziu uma elevação inferior a 1,4°C na temperatura dos animais inoculados, enquanto, elevação de 4°C foi observada nos animais inoculados com LOS não destoxificado. Estes resultados são similares aos descritos por Gu e Tsai (1991) e indicam que o dLOS estava suficientemente puro e destoxificado para a sua utilização em vacinas experimentais.

3.1.3 Formulação da vacina

A vacina foi formulada em salina, apresentando a seguinte composição: 20ug/mL de proteínas (VMEs), 20ug/mL de polissacarídeo C (FIOCRUZ, lote 03/90) e 10ug/mL de dLOS. A suspensão antigênica foi então adsorvida a 650ug/mL de hidróxido de alumínio (lote IB 94/02 - Dinamarca) e conservada em timerosal a uma concentração final de 0,01% (p/v).

3.2 Animais

A parte experimental desse trabalho foi realizada em duas fases:

3.2.1 Primeira Fase

Compreendeu a avaliação da influência do intervalo de tempo entre as doses, na resposta humoral de camundongos geneticamente homogêneos.

Foram constituídos dois grupos de 28 camundongos fêmeas, pertencentes à linhagem isogênica BALB/c, com idade de 2 a 3 meses, fornecidos pelo Biotério do Instituto Adolfo Lutz.

Os grupos foram imunizados com duas injeções intramusculares de 100 ul da vacina, sendo que para o Grupo I o intervalo entre as inoculações foi de 30 dias e para o Grupo II foi de 90 dias.

Foram colhidas amostras de sangue via plexo retroorbital antes das imunizações (soros pré), 20 dias após a imunização primária (soros de resposta primária - RP) e 15 dias após a imunização secundária (soros de resposta secundária - RS) para ambos os grupos.

3.2.2 Segunda Fase

Nesta fase, avaliou-se a influência do intervalo de tempo entre as doses na resposta humoral de diversas linhagens de camundongos.

Foram constituídos dois grupos - Grupo I e Grupo II - com números equivalentes de camundongos fêmeas de 2 a 3 meses de idade pertencentes às seguintes linhagens:

Isogênicas : BALB/c ($n=4$) e A/J ($n=4$) : fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan

Geneticamente heterogênea : "Swiss" ($n=13$ para Grupo I e $n=14$ para Grupo II) : fornecidos pelo Biotério do Instituto Adolfo Lutz

Geneticamente selecionadas : linhagens boas ("High", $n=5$) e más produtoras de anticorpos ("Low", $n=5$), provenientes da Seleção III desenvolvida no Laboratório de Imunologia do Instituto Biológico, São Paulo e mantida pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

Os grupos foram imunizados segundo o protocolo estabelecido na primeira fase.

Foram colhidas amostras de sangue, via plexo retroorbital: antes das imunizações para todos animais (soros pré), 20 e 90 dias após a imunização primária (soros de resposta primária - RP) para o Grupo I e Grupo II,

respectivamente, e 10, 90 e 220 dias após a imunização secundária (soros de resposta secundária - RS) para os dois grupos.

Os soros obtidos foram estocados a -70°C .

3.3 Estudo da resposta imune humoral induzida pela vacina

Na primeira fase, os soros dos camundongos BALB/c foram agrupados dois a dois, constituindo-se um total de 14 “pools” de soros em cada grupo e analisados nos tempos zero (soros pré), 20 dias após a imunização primária (20 dias da resposta primária-RP) e 15 dias após a imunização secundária (15 dias da resposta secundária-RS), para dosagens das concentrações de IgG específicas e para a determinação de anticorpos bactericidas.

Na segunda fase, soros pós-vacinais foram analisados individualmente para a dosagem de IgG específica. Os soros pré-vacinais foram analisados empregando-se “pools” totais.

A atividade bactericida dos anticorpos induzidos pela vacina foi determinada apenas nos soros de 10 e 90 dias após a imunização secundária. Os soros foram analisados individualmente.

A especificidade da resposta imune às proteínas da membrana externa da cepa vacinal foi avaliada empregando-se “pools” totais dos soros pré-vacinais, dos soros de resposta primária e dos obtidos 10, 90 e 220 dias após a imunização secundária, das distintas linhagens.

3.3.1 Dosagem das concentrações de IgG específicas

As concentrações de IgG específicas foram determinadas pelo ELISA, conforme descrito por Harthug et al.(1986), com algumas modificações.

Placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100µl de VMEs, extraídas da cepa N44/89, (400ng de proteína por cavidade) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5 acrescido de 0,02% de azida sódica, por aproximadamente 18 horas a 37°C e então lavadas três vezes com tampão de fosfato 0,01M acrescido de 0,05% de Tween 20, pH 7,4 ± 0,2 (tampão de lavagem).

Foram preparadas quatro diluições seriadas de cada soro em tampão de fosfato 0,01M acrescido de 0,05% de Tween 20, 0,1% de soro albumina bovina (Sigma[®]) e 0,02% de azida sódica. Os soros foram testados em duplicata.

Após incubação dos soros a 37°C por duas horas, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas a 37°C por duas horas com 100µl, por cavidade, de anticorpo anti-IgG total de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma[®]) diluído a 1:3000 no mesmo tampão de diluição dos soros.

Após novo ciclo de lavagem, a reação foi desenvolvida por 30 minutos a temperatura ambiente com 100µl por cavidade de uma solução de *p*-nitrofenil fosfato dissódico (Sigma[®]) a 1mg/mL em solução aquosa contendo 10% de dietanolamina (Merck[®]), 0,01% de cloreto de magnésio e 0,02% de azida sódica pH 9,8.

A leitura das densidades óticas (DO) de cada diluição foi processada a 405 nm em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MCC/340, MK II Labsystems).

O valor médio das DO obtidas para cada soro foi convertido em Unidades/mL (U/mL), por meio de curva padrão construída a partir de um soro de referência, para o qual foi atribuído, arbitrariamente, o valor de 1000 U/mL e estimada por um modelo paramétrico que emprega a função logistic–

log com quatro parâmetros, com o auxílio de um programa de computador (Plikaytis et al., 1996). Controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação.

3.3.2 Atividade bactericida dos soros

Foi avaliada pelo ensaio bactericida *in vitro*, realizado pelo método “agar overlay” em placas de microtitulação de fundo chato, com 96 cavidades, contra a cepa vacinal. A metodologia empregada foi a de Maslanka et al. (1997), com algumas modificações.

Os soros foram previamente inativados a 56°C por 30 minutos e diluídos em Solução de Hanks pH 7,2 acrescida de 0,1% de soro albumina bovina (Fração V, Sigma[®]), 4mM de bicarbonato de sódio e 0,1% de glicose (Solução de Hanks).

Os soros foram testados contra a cepa vacinal cultivada por quatro horas em *Tryptic Soy Broth* (TSB, Difco[®]) + 1,5% de Agar Nobre (Difco[®]) + 1% de soro de cavalo + 45µM de EDDA (ácido etileno-diamino di-*o*-hidroxifenilacético, Sigma[®]). Foi preparada uma suspensão bacteriana em Solução de Hanks com densidade ótica (DO) de aproximadamente 0,320 em 600 nm. A suspensão foi então diluída de modo a conter aproximadamente 60 a 70 unidades formadoras de colônias (ufc) por 12,5µl .

Como fonte de complemento foi usado um “pool” de soros de coelhos de 3 a 4 semanas de idade, lote nº 16721, adquirido da firma americana Pel-Freez Clinical Systems e, testado previamente quanto à ausência de anticorpos contra a cepa alvo.

A reação final (50µl) consistiu de 25µl de diluições seriadas (razão dois) dos soros, 12,5µl de fonte de complemento exógeno e 12,5µl de suspensão bacteriana. Após incubação a 37°C por 30 minutos, adicionou-se *Tryptic Soy Agar* (TSA, Difco[®]) às microplacas, seguido de incubação a 37°C/5% CO₂ por aproximadamente 18 horas.

Para controle do inóculo bacteriano, foram realizadas culturas quantitativas em placas, nos tempos zero e após 30 minutos de reação.

A susceptibilidade da bactéria ao complemento foi controlada pela reação do complemento e bactéria, nas condições descritas acima. A morte

bacteriana independente de complemento foi controlada pela reação do soro teste inativado, complemento inativado e bactéria.

O título bactericida foi definido como a recíproca da maior diluição do soro teste resultando em pelo menos 50% de morte bacteriana. Um controle positivo consistindo de soro de camundongo imunizado, com título previamente determinado foi incluído em cada microplaca.

3.3.3 Especificidade da resposta imune

A especificidade dos anticorpos IgG, induzidos pela vacina aos antígenos da membrana externa do meningococo, foi analisada pela técnica de “Immunoblot” conforme descrito por Wedege e Frøholm (1986) com algumas modificações.

Inicialmente, 150µg de proteínas de VMEs da cepa vacinal foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, em presença de dodecil sulfato de sódio, sob condições redutoras e sistema descontínuo de tampão (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) e, então, transferidas para membrana de nitrocelulose (poro de 0,45µm Bio-Rad®) a uma corrente constante de 250mA por uma hora, empregando-se o sistema de transferência eletroforética Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad®).

Após a transferência das proteínas, a membrana foi cortada em 25 fitas correspondendo cada uma a aproximadamente 6µg de proteína antes da transferência.

As fitas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Difco®) em tampão de fosfato 0,01M pH 7,4 e, então, lavadas duas vezes com tampão de fosfato 0,01M (tampão de lavagem).

“Pools” dos soros testes foram diluídos 1:200 em 0,05% de leite desnatado em tampão de fosfato 0,01M pH 7,4 (tampão de diluição dos soros) e incubados por três horas a temperatura ambiente, sob agitação suave.

A seguir as fitas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e incubadas por duas horas com o anticorpo secundário anti-IgG total de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma® A-5153), diluído a 1:10.000 no tampão de diluição dos soros.

As fitas foram novamente lavadas com tampão de lavagem por quatro vezes e a revelação foi feita com os substratos BCIP (*p*-toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfatase) (Bio-Rad®) e NBT (cloreto de *p*-nitro azul tetrazólio) (Bio-Rad®), preparados conforme instruções dos respectivos catálogos.

A reação enzimática foi interrompida pela lavagem das fitas com água destilada esterilizada.

Como marcadores de posição das bandas das principais proteínas de classe do meningococo, empregou-se, em uma fita guia, os seguintes anticorpos monoclonais (Mab) produzidos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e no Laboratório de Hibridomas de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ : Mab F8-7A2/1H11 (IAL), marcador da proteína de classe 1 soro-subtipo P1.15, diluição 1:30.000; Mab BE12 (FIOCRUZ), marcador de proteína de classe 4, diluição 1:20 e Mab AG10 (FIOCRUZ), marcador de proteína de classe 5 tipo sorológico 7 (P5.7), diluição 1:80.000.

Para controle das proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose, uma segunda fita guia foi corada com Preto de Amido 10B (Merck®).

As ligações dos anticorpos IgG específicos aos antígenos da membrana externa do meningococo foram examinadas visualmente.

3.4 Análise estatística dos dados

As médias geométricas das concentrações de anticorpos IgG obtidas em U/mL e a dos títulos de anticorpos bactericidas foram transformados para a escala logarítmica (\log_2) e o nível de significância entre as médias foi determinado pelo Teste t de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Níveis de IgG e anticorpos bactericidas

Conforme pode ser observado nas Tabelas 1 a 3, a vacina foi imunogênica e induziu memória imunológica, com altos títulos de anticorpos bactericidas em todas as linhagens de camundongos estudadas.

Na primeira fase desse estudo, observou-se um aumento estatisticamente significativo, tanto nos níveis de IgG ($P < 0,005$) como nos títulos de anticorpos bactericidas ($P < 0,005$), nos soros de 15 dias da resposta secundária dos camundongos BALB/c imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses (Grupo II), comparativamente aos soros de 15 dias da resposta secundária dos camundongos imunizados com intervalo de 30 dias (Grupo I) (Tabela 1).

Comparando-se a cinética da resposta de IgG das populações isogênicas, BALB/c e A/J, e das populações geneticamente selecionadas, "High" e "Low", com a cinética da resposta da população heterogênea, "Swiss", (Figura 1), observa-se que o maior espaçamento entre as doses (Grupo II), induziu uma aproximação e uma melhor duração dos títulos dos animais que apresentaram na resposta primária, níveis mais baixos de anticorpos, "Low" e BALB/c, relativamente aos títulos médios mais freqüentes encontrados na população geneticamente heterogênea ("Swiss").

O mesmo pode ser observado quando grupos geneticamente homogêneos são comparados:

- camundongos geneticamente selecionados para má resposta de anticorpos ("Low") tiveram sua resposta imune favorecida no Grupo II. Desta forma, as diferenças dos níveis de IgG (\log_2) entre "High" e "Low", na resposta secundária, foram de 2,2 (10d) ($P>0,05$), 2,2 (90d) ($P<0,05$) e 1,3 (220d) ($P>0,05$) relativamente a 4,2 (10d), 4,0 (90d) e 3,9 (220d) ($P<0,005$ em todos os tempos) obtidas no Grupo I (Tabela 2 e Figura 2). Comportamento semelhante foi obtido na resposta de anticorpos bactericidas, onde as diferenças entre os títulos (\log_2) das duas linhagens foram de 2,4 (10d) e 2,2 (90d) ($P>0,05$ para ambos os tempos) relativamente a 4,8 (10d) e 4,9 (90d) ($P<0,005$ para ambos os tempos) obtidas no Grupo I (Tabela 3 e Figura 4).
- Entre as linhagens isogênicas, os BALB/c que no Grupo I, apresentaram níveis mais baixos de IgG ($P<0,025$ na resposta primária e $P<0,005$ no tempo de 90 dias da resposta secundária) e de anticorpos bactericidas que os camundongos A/J, também foram favorecidos pelo maior intervalo entre as doses, apresentando no Grupo II a mesma amplitude de resposta em níveis de IgG ($P>0,05$ na resposta primária e em todos os tempos da resposta secundária) (Tabela 2 e Figura 3) e em títulos de anticorpos bactericidas (Tabela 3 e Figura 5) que os camundongos A/J.

Concluindo, a resposta de IgG entre os camundongos de mesma linhagem, (Tabela 2), foi maior nos camundongos do Grupo II, para as linhagens "Low" e BALB/c, embora tenha sido possível demonstrar estatisticamente esta diferença ($P<0,05$) apenas nos soros de 90 dias da resposta secundária da linhagem BALB/c. Em relação aos anticorpos bactericidas, embora não se tenha observado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos I e II para as diferentes linhagens de camundongos, as linhagens "Low" e BALB/c atingiram níveis mais altos no Grupo II, em relação ao Grupo I (Tabela 3).

O aumento do intervalo de tempo entre as doses, de um modo geral, não interferiu na resposta dos camundongos apresentando fenótipos de boa resposta, como os das linhagens "High", "Swiss" e A/J, sendo os níveis de IgG específica assim como os títulos de anticorpos bactericidas obtidos no Grupo II muito semelhantes aos obtidos no Grupo I, com exceção à resposta de IgG dos camundongos "Swiss" no tempo de 90 dias da resposta secundária, onde foram observados títulos significativamente menores ($P < 0,05$) no Grupo II em comparação aos camundongos "Swiss" do Grupo I (Tabela 2), entretanto, essa diferença não foi observada nos títulos de anticorpos funcionais (Tabela 3).

Tabela 1- Resposta de IgG e anticorpos bactericidas anti- *Neisseria meningitidis* (cepa N44/89) em soros de camundongos BALB/c imunizados com duas doses da vacina experimental na primeira fase do estudo

| grupos | n | U/mL de IgG ^a | | Títulos bactericidas ^a | |
|-----------|----|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| | | 20d RP | 15d RS | 20d RP | 15d RS |
| I | 14 | 7,0 ± 1,0 | 9,3 ± 1,0 ^b | 9,2 ± 1,7 | 10,6 ± 1,5 ^c |
| II | 14 | 7,6 ± 1,0 | 10,5 ± 1,1 ^b | 9,6 ± 0,9 | 12,9 ± 1,2 ^c |

^a média geométrica (\log_2) ± 1 desvio padrão

n = número de camundongos em cada grupo RP = resposta primária

RS = resposta secundária. Grupo **I** = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses. Grupo **II** = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses.

^b Diferença de níveis de IgG entre grupos I e II $P < 0,005$

^c Diferença de títulos de anticorpos bactericidas entre grupos I e II $P < 0,005$

IgG nos soros pré-vacinais de ambos os grupos ⇒ média de 10 Unidades/mL

Títulos de anticorpos bactericidas nos soros pré-vacinais de ambos os grupos ⇒ <2

Tabela 2- Níveis de IgG anti-*Neisseria meningitidis* (cepa N44/89) induzidos pela vacina experimental em soros de camundongos de diferentes linhagens pertencentes aos Grupos I e II

| animais | grupos (n) | U/mL de IgG ^a | | | | |
|---------|------------|--------------------------|------------|------------|-------------------------|------------|
| | | 20d RP | 90d RP | 10d RS | 90d RS | 220d RS |
| High | I (5) | 11,9 ± 0,5 | NR | 14,5 ± 0,8 | 12,3 ± 0,5 | 10,6 ± 0,4 |
| | II (5) | NR | 10,4 ± 0,5 | 14,1 ± 0,7 | 12,2 ± 0,2 | 10,5 ± 0,5 |
| Low | I (5) | 8,4 ± 0,7 | NR | 10,3 ± 0,5 | 8,3 ± 0,6 | 6,7 ± 0,7 |
| | II (5) | NR | 8,3 ± 1,3 | 11,9 ± 2,1 | 10,0 ± 1,5 | 9,2 ± 1,9 |
| BALB/c | I (4) | 8,1 ± 0,7 | NR | 11,2 ± 1,0 | 8,5 ± 0,6 ^b | 7,7 ± 0,9 |
| | II (4) | NR | 7,5 ± 1,7 | 12,4 ± 1,5 | 10,5 ± 1,1 ^b | 8,9 ± 1,5 |
| A/J | I (4) | 10,3 ± 1,1 | NR | 12,4 ± 1,3 | 11,4 ± 1,0 | 8,8 ± 0,7 |
| | II (4) | NR | 8,3 ± 0,9 | 12,0 ± 1,5 | 10,4 ± 2,2 | 8,5 ± 1,8 |
| Swiss | I (13) | 9,2 ± 1,2 | NR | 13,2 ± 1,2 | 11,6 ± 0,8 ^c | 10,5 ± 0,5 |
| | II (14) | NR | 9,4 ± 0,8 | 12,6 ± 1,1 | 10,9 ± 0,8 ^c | 10,3 ± 0,3 |

^a média geométrica (\log_2) ± 1 desvio padrão

n = número de camundongos em cada grupo. RP = resposta primária. RS = resposta secundária. Grupo I = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses.

Grupo II = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses.

NR = não realizado

^b Diferença de níveis de IgG entre grupos I e II $P < 0,05$

^c Diferença de níveis de IgG entre grupos I e II $P < 0,05$

Os valores de IgG nos "pools" totais dos soros pré-vacinais das diferentes linhagens variaram entre 3 e 10 Unidades/mL

Tabela 3- Títulos de anticorpos bactericidas anti-*Neisseria meningitidis* (cepa N44/89) induzidos pela vacina experimental em soros de camundongos de diferentes linhagens pertencentes aos Grupos I e II

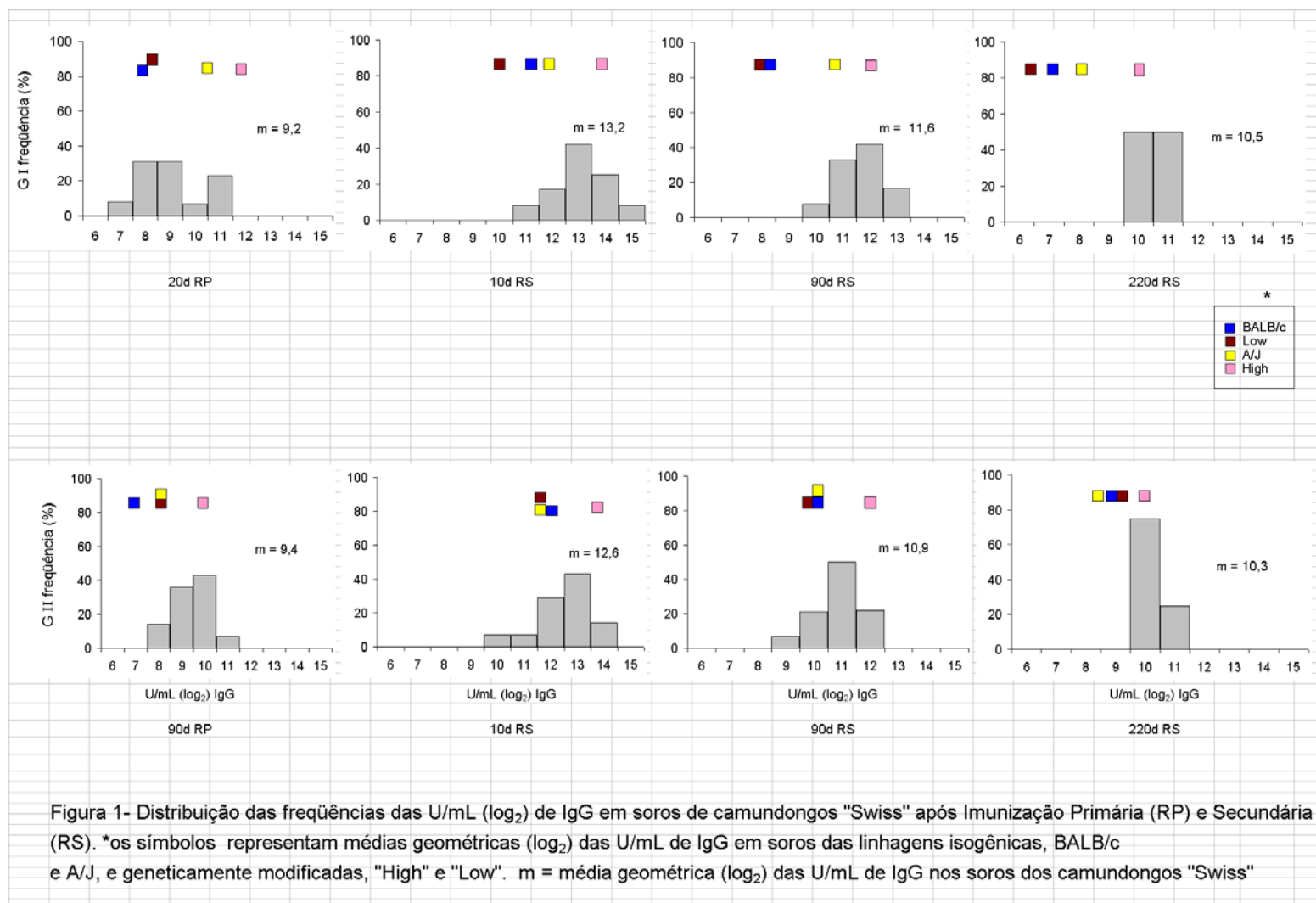
| animais | grupos (n) | Títulos bactericidas ^a | |
|---------|----------------|-----------------------------------|------------|
| | | 10d RS | 90d RS |
| High | I (5) | 16,0 ± 1,2 | 14,2 ± 1,3 |
| | II (5) | 14,4 ± 1,1 | 13,0 ± 1,4 |
| Low | I (5) | 11,2 ± 0,8 | 9,3 ± 1,0 |
| | II (5) | 12,0 ± 2,8 | 10,8 ± 3,1 |
| BALB/c | I (4) | 13,0 ± 1,4 | 10,7 ± 1,2 |
| | II (4) | 13,3 ± 0,5 | 11,7 ± 0,6 |
| A/J | I (4) | 14,8 ± 1,0 | 12,3 ± 0,5 |
| | II (4) | 14,0 ± 1,4 | 11,5 ± 2,4 |
| Swiss | I (13) | 15,0 ± 0,8 | 13,5 ± 1,0 |
| | II (14) | 14,3 ± 0,5 | 12,8 ± 1,0 |

^a média geométrica (\log_2) ± 1 desvio padrão

n = número de camundongos em cada grupo. RS = resposta secundária.

Grupo **I** = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses.

Grupo **II** = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses.



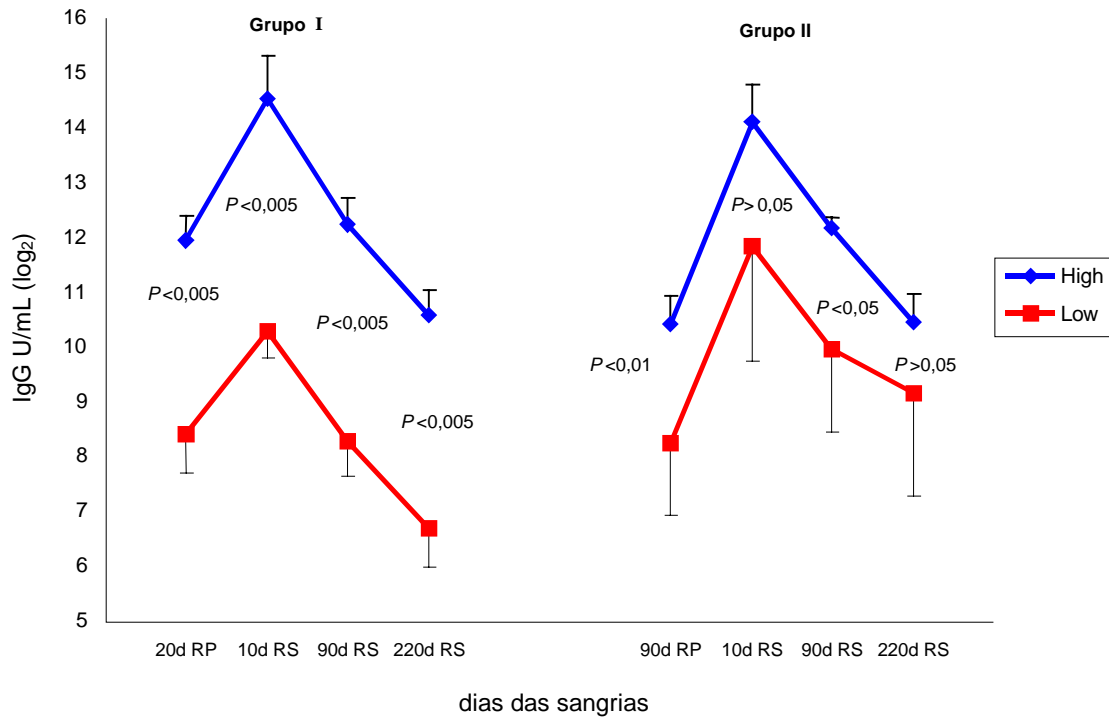


Figura 2- Cinéticas dos anticorpos IgG anti-*Neisseria meningitidis* (cepa N44/89) nos soros dos camundongos das linhagens geneticamente selecionadas, "High" e "Low", imunizados com duas doses da vacina experimental. Grupo I = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses. Grupo II = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses. RP = resposta primária, RS = resposta secundária.

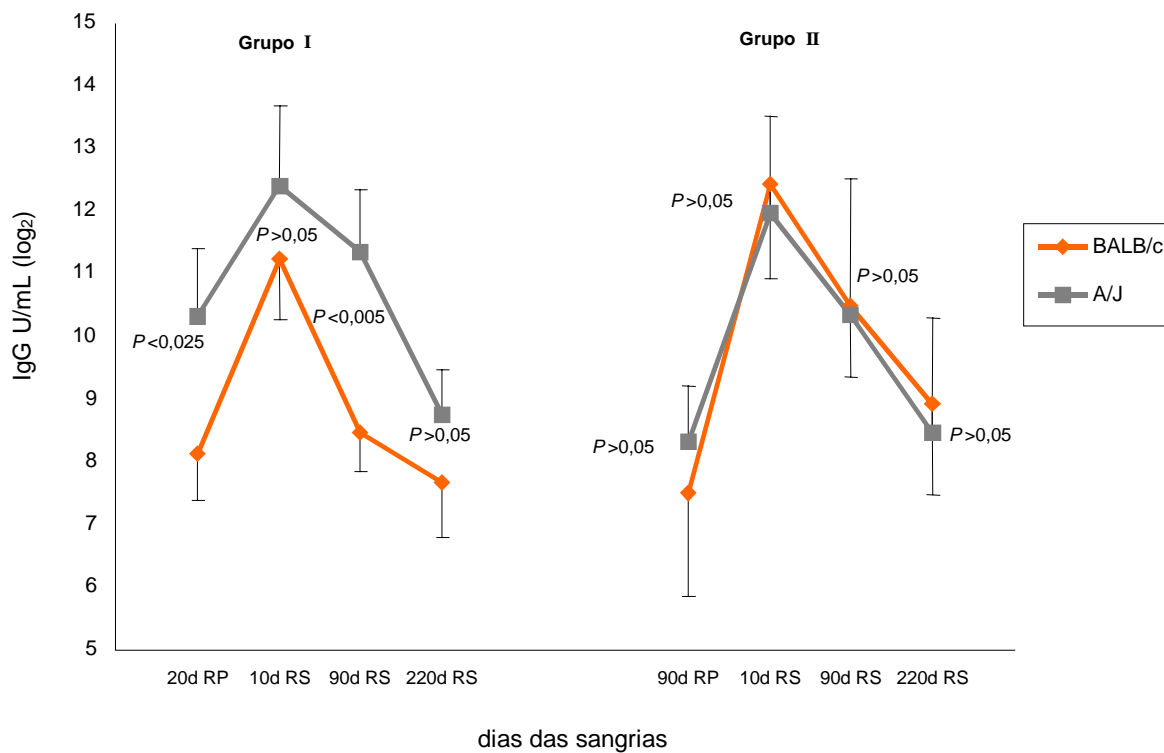


Figura 3- Cinética dos anticorpos IgG anti-*Neisseria meningitidis* (cepa N44/89), nos soros de camundongos das linhagens isogênicas, BALB/c e A/J, imunizados com duas doses da vacina experimental.

Grupo I = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses.

Grupo II = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses.

RP = resposta primária, RS = resposta secundária.

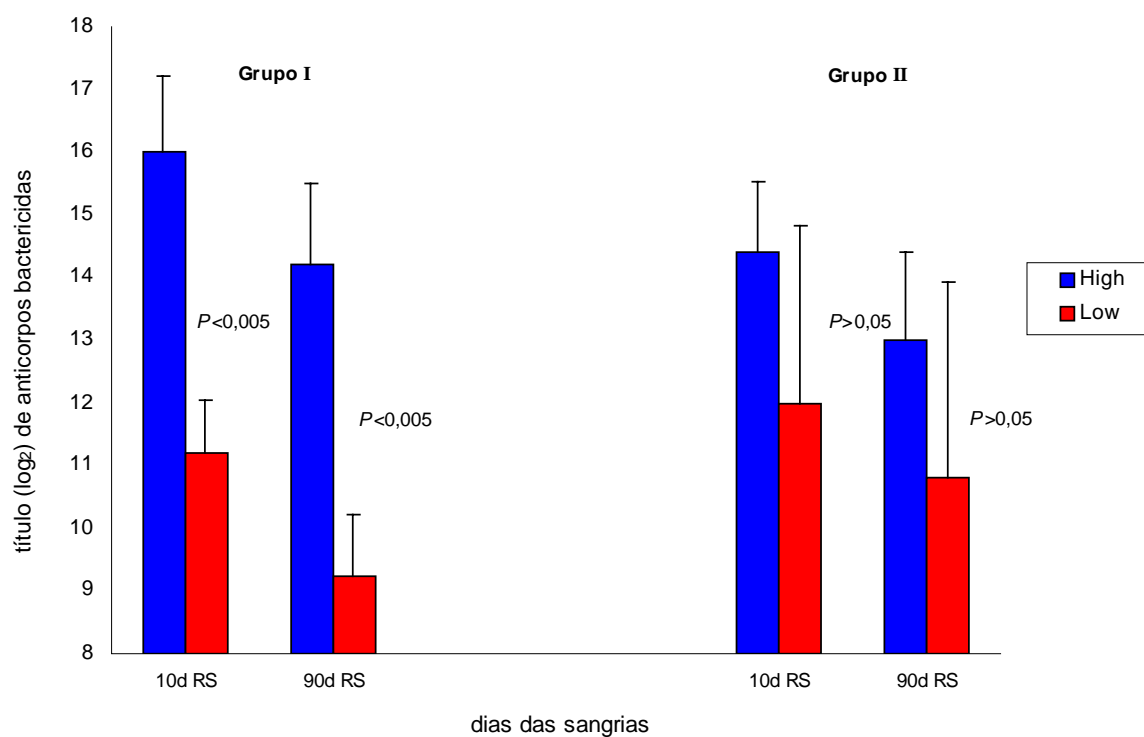


Figura 4- Anticorpos bactericidas anti-*Neisseria meningitidis* (cepa N44/89) nos soros de camundongos das linhagens geneticamente selecionadas, “High” e “Low”, imunizados com duas doses da vacina experimental.

Grupo I = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses.

Grupo II = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses.

RP = resposta primária, RS = resposta secundária.

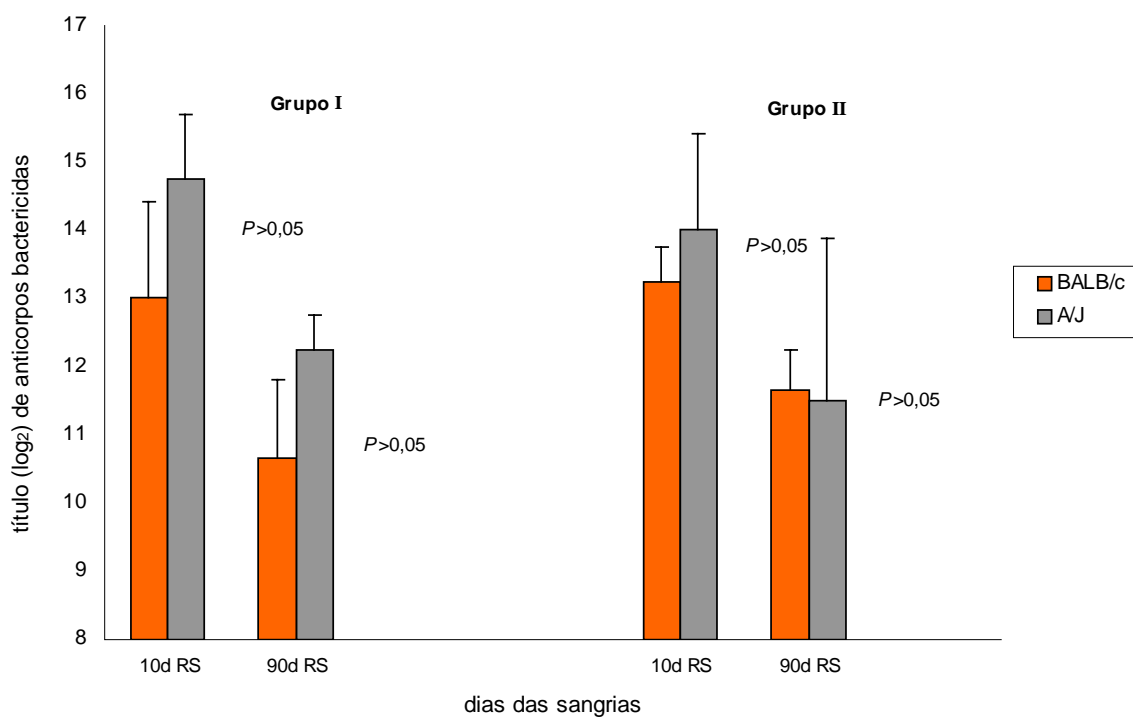


Figura 5- Anticorpos bactericidas anti-*Neisseria meningitidis* (cepa N44/89) nos soros de camundongos das linhagens isogênicas, BALB/c e A/J, imunizados com duas doses da vacina experimental.

Grupo **I** = camundongos imunizados com intervalo de 30 dias entre as doses.

Grupo **II** = camundongos imunizados com intervalo de 90 dias entre as doses.

RP = resposta primária, RS = resposta secundária.

4.2 Especificidade da resposta imune

A especificidade dos anticorpos IgG nos “pools” totais dos soros das diferentes linhagens, obtidos antes e após as imunizações primária e secundária foi analisada por “Immunoblot” empregando-se VMEs da cepa N44/89 como antígeno.

A resposta de IgG nos “Immunoblots” (Figura 6) foi dirigida principalmente contra as proteínas de classe 1, 3 e 5. Anticorpos específicos para a proteína de classe 4 foram observados nos soros de 10 dias da RS dos camundongos da linhagem "High" dos Grupos **I** e **II**, nos soros de 10 dias da RS dos camundongos "Low" do Grupo **II** e nos soros de 10, 90 e 220 dias da RS dos camundongos “Swiss” de ambos os Grupos. Não foram observados anticorpos específicos para a proteína de classe 4 nos soros de camundongos das linhagens isogênicas BALB/c e A/J.

Independente de qualquer variável, os soros de todos animais apresentaram intensa resposta a uma proteína de peso molecular de aproximadamente 190 kDa citada por Fukusawa et al. (2000, 2003).

Analisando-se os resultados, tanto dos soros dos camundongos do Grupo **I** como do Grupo **II**, observou-se de maneira geral, para todas as linhagens, que a intensidade das bandas visualizadas teve boa concordância com a cinética de anticorpos IgG dosados pelo ELISA, sendo mais intensas após a imunização secundária em relação à primária, apresentando um aumento maior nas amostras de soros de 10 dias da RS e diminuindo nas amostras de 90 e 220 dias.

As diferenças de reações observadas entre camundongos de mesma linhagem, imunizados com 30 ou 90 dias de intervalo de tempo entre as doses, também corroboraram os resultados obtidos pelo ELISA. Soros dos

camundongos "Low" e BALB/c do Grupo **II** apresentaram, após a imunização secundária, reações mais intensas com as proteínas de classe 1, 3 e 5 que as observadas nessas mesmas linhagens, no Grupo **I**. Houve também melhor manutenção da intensidade das bandas após 90 e 220 dias no Grupo **II**, em relação ao Grupo **I**, indicando que essas linhagens, que em relação às demais, responderam com níveis mais baixos de anticorpos após a imunização primária, foram favorecidos não só com um aumento do nível de anticorpos, como também com uma resposta mais duradoura quando imunizados com um maior intervalo de tempo entre as doses.

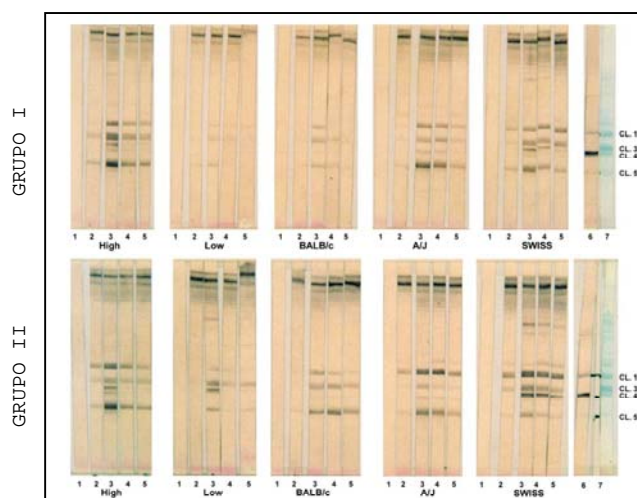


Figura 6- Especificidade de IgG nos “pools” dos soros das diferentes linhagens de camundongos dos Grupos I e II às proteínas de membrana externa da cepa N44/89

Fitas 1 - soros pré-vacinais

Fitas 2 - soros de resposta primária (RP)

Fitas 3, 4 e 5 - soros de 10, 90 e 220 dias de resposta secundária (RS)

Fitas 6 – anticorpos monoclonais marcadores de classe 1, 4 e 5

Fitas 7 - proteínas transferidas – Coloração com Preto de Amido 10B

5. DISCUSSÃO

A situação epidêmica da Doença Meningocócica pelo sorogrupo B no Brasil, que teve início na década de 80 atingindo níveis preocupantes nos anos 89/90 com epicentro na Grande São Paulo, levou as autoridades sanitárias a realizarem, naqueles anos, uma campanha quando foram imunizadas 2,4 milhões de crianças com idades entre 3 meses e 7 anos, com a vacina VA-MENGOC-BC[®]. Entretanto, nenhuma proteção foi observada nos vacinados com idade inferior a 2 anos, o grupo com maior risco de adquirir a doença (de Moraes et al., 1992).

A baixa eficácia protetora obtida motivou o desenvolvimento de uma vacina brasileira contra o meningococo sorogrupo B, cujos estudos iniciaram-se nessa época. O projeto inicial contemplava uma vacina composta de VMEs de meningococo sorogrupo B representante do então clone epidêmico [B:4,7:P1.19,15], ainda predominante, acrescida de polissacarídeo C livre, LOS destoxificado e Al(OH)₃.

Os resultados obtidos através dos ensaios clínicos realizados em várias partes do mundo com as vacinas protéicas contra meningococo B, mostram que em adultos, mas principalmente em crianças, a resposta humoral induzida é restrita ao soro-subtipo específico da cepa vacinal homóloga (Rosenqvist et al., 1995; Perkins et al., 1998; Tappero et al., 1999). Frente a esses estudos e ao perfil epidemiológico das cepas circulantes no país, monitorizado pelo Instituto Adolfo Lutz, tem-se, atualmente, a proposta de inclusão de VMEs de cepa do soro-subtipo [B:4,7:P1.7,1] que corresponde ao segundo fenótipo de meningococo B prevalente no Brasil. Esse novo protocolo para o desenvolvimento da vacina contempla também a substituição do polissacarídeo livre por sua forma conjugada.

A baixa eficácia das vacinas de VMEs contra o sorogrupo B, observada nos ensaios clínicos realizados em diferentes países, tem mostrado a necessidade de novas pesquisas buscando-se estratégias alternativas para aumentar a imunogenicidade das mesmas, principalmente em crianças. Desse modo, diferentes adjuvantes têm sido testados, assim como esquemas vacinais distintos (Kleijn et al., 2000; 2001).

Entretanto, o que tem sido apresentado como alternativa em relação a esquemas vacinais é a inclusão de uma terceira dose (Rosenqvist et al., 1995; Perkins et al., 1998; Tappero et al., 1999). Existem poucos dados na literatura comparando-se a influência do intervalo de tempo entre as doses vacinais na modulação da resposta imune aos antígenos do meningococo sorogrupo B (Kleijn et al., 2001) Essa lacuna, associada à experiência anterior, realizada no Instituto Butantan sob orientação do Dr. Osvaldo Sant'Anna, comparado-se dois esquemas de inoculações para obtenção de soros hiperimunes de cavalos, onde o aumento do intervalo entre doses induziu melhores respostas de anticorpos contra toxina tetânica (comunicação pessoal), levou ao presente estudo.

Na primeira fase deste estudo, o ensaio realizado com camundongos BALB/c, indicou a influência, estatisticamente significativa do intervalo do tempo entre as doses, favorecendo o grupo imunizado com intervalo maior (90 dias), no qual observaram-se níveis de IgG e de anticorpos bactericidas estatisticamente mais altos na resposta secundária. Esses dados conduziram à extensão da avaliação desse fenômeno a outras linhagens de camundongos, uma vez que cada linhagem isogênica representa, dentro de uma população natural, apenas um indivíduo.

A diferença de resposta obtida entre os grupos do primeiro experimento foi observada também, entre os camundongos BALB/c no segundo experimento em relação aos anticorpos IgG, mas não quanto aos níveis de anticorpos bactericidas.

O maior intervalo entre as imunizações também influenciou positivamente a resposta imune humoral dos camundongos geneticamente modificados da linhagem “Low”, cujos níveis de anticorpos aumentaram, aproximando-se dos títulos obtidos na linhagem “High”. Assim, houve alteração do padrão de resposta de anticorpos, diminuindo a diferença interlinhagens “High” e “Low”, modulando o fenótipo de má resposta e influenciando o grau do efeito multiespecífico estabelecido a partir da separação máxima obtida com os antígenos de seleção (Biozzi et al., 1979). Esse efeito que se reproduz para outros antígenos não relacionados, estendeu-se também aos antígenos do meningococo, o que foi demonstrado pelas diferenças de resposta de anticorpos entre linhagens “High” e “Low” quando o intervalo entre as imunizações foi de 30 dias (Grupo I).

De modo geral, os camundongos que apresentaram um padrão de boa resposta primária de anticorpos não sofreram alteração nesse padrão com o aumento do intervalo de tempo entre doses.

A proteção à Doença Meningocócica pelos sorogrupos A, B e C tem sido relacionada a níveis mínimos de anticorpos bactericidas séricos (Goldschneider et al., 1969a) e a indução desses anticorpos é, portanto, o objetivo das vacinas. As determinações das concentrações de anticorpos totais e de anticorpos bactericidas em soros de vacinados têm sido empregadas na avaliação da eficácia protetora das vacinas contra os sorogrupos A e C, sendo que, concentrações de 1-2 $\mu\text{g/ml}$ de IgG e títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 podem estar correlacionados com a proteção (Borrow et al., 2001b). A OMS recomenda ainda que uma vacina eficaz deva induzir um aumento mínimo de quatro vezes nos títulos de anticorpos bactericidas em relação aos títulos pré-vacinais, num número superior a 90% dos vacinados (WHO, 1976).

Em relação à avaliação de eficácia das vacinas contra meningococo sorogrupo B existem ainda poucos dados sobre marcadores de proteção

apropriados. A dosagem de anticorpos bactericidas nos soros de vacinados tem sido referendada como o padrão de excelência na avaliação da imunidade protetora induzida pelas vacinas, tendo como base, principalmente, os estudos de Goldschneider et al. (1969a), os quais demonstraram que a aquisição de anticorpos bactericidas, do mesmo modo que para os sorogrupos A e C, correlaciona-se inversamente com a incidência da doença. Os estudos de De Moraes et al. (1992) e Milagres et al. (1994) também trouxeram grandes contribuições nesse sentido, uma vez que foram capazes de correlacionar a eficácia protetora de vacina antimeningocócica B e níveis de anticorpos bactericidas nos soros de vacinados.

A presença de uma fração significativa de não respondedores a uma determinada vacina pode debilitar sua efetividade, seja pela falência em atingir metas de proteção em programas de imunização em nível de população, seja pela incapacidade de proteger individualmente (Hackett, 1998). Assim, torna-se importante que todos os indivíduos imunizados consigam atingir um nível mínimo de anticorpos protetores que eventuais indivíduos maus respondedores possam não atingir.

Os mecanismos que estariam envolvidos nessa mudança de padrão de resposta imune não foram suficientemente esclarecidos, mas é importante considerar que a estimulação eficaz de populações de linfócitos T e B e a indução de memória podem não ocorrer de maneira linear resultando, portanto, em subpopulações celulares qualitativamente diferentes, no decorrer da resposta imune. Condições de sensibilização diferentes, como a duração do estímulo e/ou o tipo de citocinas evocadas, podem afetar a formação dessas subpopulações.

Maturação da afinidade de anticorpos e geração de memória em resposta a antígenos protéicos são fenômenos clássicos. Ambos refletem um processo evolutivo no qual mutantes são gerados a partir de um

repertório primário de células B e selecionados com base na afinidade (Berek e Milstein, 1987, 1988) com que se ligam ao antígeno determinado. Assim, a resposta humoral específica induzida após o primeiro encontro é composta predominantemente de anticorpos IgM de baixa afinidade. Entretanto, a quantidade e qualidade dos anticorpos mudam durante o curso da resposta primária de tal modo que, em seus estágios avançados, há mudança de isotipo de IgM para IgG ou outra classe e com maior afinidade, decorrentes da maturação da resposta. Um novo contato com o antígeno estimula uma resposta secundária mais rápida e elevada, representada principalmente por IgG.

Após estímulo antigênico, nos folículos primários dos órgãos linfóides periféricos, as células B específicas para o antígeno migram em direção à zona rica em linfócitos T. A interação de linfócitos B e T estimulados, que ocorre na interface do folículo e zona de células T, resulta em expansão dos clones de células B específicos. Alguns desses clones proliferam em sítios extrafoliculares diferenciando-se em plasmócitos; outros migram para o interior dos folículos onde sofrem multiplicação intensa, formando os centros germinativos (Berek et al, 1991). Nesse ambiente, estimuladas por células T auxiliares, as células B são submetidas a ciclos repetidos de hipermutações somáticas dos genes H e L das regiões variáveis das moléculas de imunoglobulina de superfície, aumentando a afinidade dos sítios combinatórios do anticorpo. Os clones de células B são então selecionados pela maior afinidade com que se ligam aos complexos antígeno/anticorpo e/ou complemento, retidos nas superfícies de células dendríticas foliculares (Rajewsky, 1996). Algumas células sobreviventes dessa seleção sofrem mudança de classe de isotipo, deixam o centro germinativo e se diferenciam em plasmócitos, enquanto outras permanecem como células de memória, podendo continuar nos linfonodos ou, atingindo a circulação, irão se fixar em outros tecidos linfóides. As células de memória tipicamente possuem receptores de antígenos de alta afinidade que, normalmente, sofreram mudança de isotipo. A produção de grande quantidade de anticorpos de alta

afinidade, o que caracteriza a resposta secundária ao antígeno, pode ser atribuída à ativação dessas células nos centros germinativos e à rápida formação de complexos imunes que podem ser concentrados nas células dendríticas foliculares.

Muitas das características da resposta de memória e de suas diferenças em relação à resposta primária deve-se à ação das células T auxiliares.

Alguns dos mecanismos relevantes de ativação de células B por células T auxiliares são mediados por moléculas inseridas às membranas e por citocinas secretadas pelas células T. Células T auxiliares CD4⁺ ativadas expressam uma proteína de superfície chamada CD40L capaz de ligar-se ao receptor CD40 nos linfócitos B e em outras células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo um fator crítico para o desempenho das funções efetoras das células T, tais como a estimulação de células B para produção de anticorpos e maturação em células de memória. Um dos efeitos da interação dessas moléculas é aumentar a expressão das moléculas co-estimulatórias, B7-1 e B7-2, nas APCs, assim como seus receptores nas células T, quais sejam as moléculas CD28, o que resulta em uma maior ativação dessa população. Essas moléculas participam também na indução de células de memória, pois a morte programada das células é bloqueada por vários estímulos que incluem reconhecimento do antígeno, fatores de crescimento e a interação de CD28 e B7. Esses estímulos induzem a expressão de moléculas antiapoptóticas da família Bcl (Abbas et al., 2000).

Como os principais segmentos efetores da resposta imune acham-se sob controles poligênicos, diversos mecanismos podem ter influenciado as expressões fenotípicas individuais caracterizadas no presente estudo. Entre esses, aqueles relacionados à apresentação de antígeno e aqueles envolvidos na diferenciação e maturação da afinidade dos anticorpos.

Pode-se sugerir, pelos conhecimentos sobre os processos de maturação e geração de células de memória, que o maior intervalo entre as doses possa ter proporcionado maior tempo de contato das células B com o antígeno retido nas células foliculares dos centros germinativos, resultando em maiores oportunidades de seleção e amplificação de clones de células B de memória. Essa diferenciação estaria refletida no aumento dos níveis de IgG. Poderia ter havido também, oportunidade para um número maior de hipermutações dos genes VH e VL ter ocorrido, resultando em repertórios de células B de afinidades mais elevadas para o antígeno. Embora nenhum ensaio específico para medida da afinidade de anticorpos tenha sido realizado, o aumento dos títulos de anticorpos bactericidas reflete uma medida indireta na avaliação da maturação da afinidade pois em geral, anticorpos de alta avides são bactericidas (Hetherington e Lepow, 1992; Richmond et al., 2001; Vermont et al., 2002).

Vários trabalhos têm proposto que a afinidade aumenta até um limite a partir do qual, as hipermutações não necessariamente se correlacionam com aumento na afinidade do anticorpo (Berek e Milstein, 1987; Batista e Neuberger, 1998; Neuberger et al., 2000). Esse limite poderia explicar as diferenças observadas entre as respostas de camundongos bons respondedores, que não sofreram interferência do aumento de tempo entre as doses por, supostamente, haverem alcançado esse limite mais rapidamente e, de camundongos maus respondedores, que se beneficiariam do maior tempo para atingir esse possível limite de afinidade.

As análises das especificidades dos anticorpos pelo “Immunoblot” mostram que houve pouca diferença na resposta dos dois grupos para as linhagens “High”, A/J e “Swiss”, havendo entretanto, aumento de intensidade de reação com as proteínas de classe 1, 3 e 5 nos soros dos camundongos “Low” e BALB/c do grupo II, comparativamente aos do grupo I. Essas diferenças podem ser reflexo da maior concentração de anticorpos induzidos nos camundongos do grupo II, como também de uma maior afinidade desses anticorpos pois as proteínas de classe 1 e 5 induzem anticorpos

bactericidas (Rosenqvist et al., 1995; Milagres et al, 1998; Tappero et al, 1999). As de classe 3 e, em menor extensão, as de classe 1, induzem anticorpos opsonizantes (Delvig et al, 1997; Lehmann et al., 1999) que parecem, também, ter um papel importante na defesa contra a Doença Meningocócica pelo sorogrupo B, uma vez que tem sido observada associação entre baixos níveis de atividade opsonizante dos soros e severidade da doença (Halstensen et al, 1989). Anticorpos específicos para proteína de classe 4, cuja função biológica ainda é desconhecida, foram observados em soros de camundongos geneticamente selecionados e de camundongos heterogêneos, mas não em soros de camundongos isogênicos, sugerindo a existência, nestas linhagens, de genes defectivos para o reconhecimento e ou resposta de anticorpos à proteína.

O maior intervalo entre doses pode, ainda, ter colaborado na diminuição da resposta supressora, que pode ser acionada pelo excesso de estímulo. Células T e B ativadas podem, por repetidas estimulações antigênicas, co-expressar as moléculas de Fas e FasL cuja interação resulta em apoptose (Abbas et al., 2000).

O fenômeno biológico observado pode também ser a soma desses vários fatores.

Pesquisas, visando o conhecimento dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta de anticorpos observada no modelo murino apresentado nesse trabalho, poderão contribuir para o entendimento dos processos de imunização visando melhores critérios para estabelecimento de vacinas mais eficazes. Aspectos como a estimativa da avidéz como indicativo de maturação dos anticorpos produzidos, bem como o efeito de uma dose reforço nos grupos imunizados com diferentes intervalos de tempo entre as doses são de grande relevância e deverão ser incluídos em estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o intervalo de 90 dias entre as doses favorece indivíduos que respondem com níveis mais baixos de anticorpos após a primeira dose. Houve melhora, não só na amplitude, como na duração de resposta, o que sugere uma indução mais eficaz do potencial de memória.

O fenômeno aqui observado sugere que esquemas diferenciados de imunização poderiam colaborar para a eficácia vacinal em populações naturais que, a exemplo dos grupos estudados, incluem fenótipos de má resposta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 4.ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders; 2000. 182p.
2. Achtman M, Wall RA, Bopp M, Kusecek B, Morelli G, Saken E, et al. Variation in class 5 protein expression by serogroup A meningococci during a meningitis epidemic. *J Infect Dis* 1991; 164:375-82.
3. Achtman, M. Global epidemiology of meningococcal disease. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal Disease*. Chichester: John Wiley & Sons; 1995. p.159-75.
4. Ala'Aldeen DAA, Cartwright KAV. *Neisseria meningitidis*: Vaccines and vaccine candidates. *J Infect* 1996; 33:153-7.
5. Ayala P, Lin L, Hopper S, Fukuda M, So M. Infection of epithelial cells by pathogenic *Neisseriae* reduces the level of multiple lysosomal constituents. *Infect Immun* 1998; 66: 5001-07.
6. Bartoloni A, Norelli F, Ceccarini C, Rappuoli R, Costantino P. Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM₁₉₇ via adipic acid dihydrazide. *Vaccine* 1995; 13: 463-70.

7. Bash MC, Lesiak KB, Banks SD, Frasch CE. Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques. *Infect Immun* 1995; 63: 1484-90.
8. Batista FD, Neuberger MS. Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* 1998; 8:751-9.
9. Begg N. Outbreak management. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal Disease*. Chichester: John Wiley & Sons; 1995. p.285-305
10. Berek C, Milstein C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 1987; 96:23-41.
11. Berek C, Milstein C. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev* 1988; 105:5-23.
12. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991; 67:1121-9.
13. Biozzi G, Mouton D, Sant'Anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol* 1979; 85:31-98.
14. Bjune G, Grønnesby JK, Høiby EA, Closs O, Nøkleby H. Results of an efficacy trial with an outer membrane vesicle vaccine against systemic serogroup B meningococcal disease in Norway. *NIPH Ann* 1991; 14:125-32.

15. Borrow R, Joseph H, Andrews N, Acuna M, Longworth E, Martin S, et al. Reduced antibody response to revaccination with meningococcal serogroup A polysaccharide vaccine in adults. *Vaccine* 2001a; 19:1129-32.
16. Borrow R, Andrews N, Goldblatt D, Miller E. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom: reevaluation of correlates of protection. *Infect Imm* 2001b; 69:1568-73.
17. Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. *Vaccine* 1995; 9: 821-9.
18. Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, Skulberg A, Bruun, JN, Halvorsen S, et al. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis* 1989; 159:195-204.
19. Brandtzaeg P, Bryn K, Kierulf P, Ovestebo R, Namork E, Aase B, et al. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *J Clin Invest* 1992; 89: 816-23.
20. Brandtzaeg P. Pathogenesis of meningococcal Infections. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal Disease*. Chichester: John Wiley & Sons; 1995. p.71-113
21. Broome CV. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18A: 25-34.

22. Cartwright K, Morris R, Rümke H, Fox A, Borrow R, Begg N, et al. Immunogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* 1999; 17:2612-9.
23. Catlin WB. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J Infect Dis* 1973; 128:178-94.
24. Caugant DA, Mooma LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* 1987; 169: 2781-92.
25. Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, et al. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine* 1996; 14:1001-8.
26. da Silva AC, Souza KW, Machado RC, Silva MFS, Sant'Anna OA. Genetics of immunological tolerance: I. Bidirectional selective breeding of mice for oral tolerance. *Res Immunol* 1998; 149: 151-61.
27. de Moraes JC, Perkins BA, Camargo MCC, Hidalgo NTR, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil. *Lancet* 1992; 340:1074-8.

28. de Vries FP, van der Ende A, van Putten JPM, Dankert J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* 1996; 2998-3006.
29. de Vries FP, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JP. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* 1998; 27:1203-12.
30. Delvig AA, Michaelsen TE, Aase A, Høiby EA, Rosenqvist E. Vaccine-induced IgG antibodies to the linear epitope on the PorB outer membrane protein promote opsonophagocytosis of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84:27-35.
31. DeVoe IW, Gilchrist JE. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 1973; 138:1156-67.
32. DeVoe IW. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1982; 46:162-90.
33. Estabrook MM, Griffiss JM, Jarvis GA. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-*N*-neotetraose. *Infect Immun* 1997; 65:4436-44.
34. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998. *Boletim Epidemiológico* 1999;3(Edição especial):9-10.

35. Feavers IM, Suker J, Mckenna AJ, Heath AB, Maiden MCJ. Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1992; 60:3620-9.
36. Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 504-10.
37. Frasch CE, Tsai CM, Mocca LF. Outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: structure and importance in meningococcal disease. *Clin Invest Med* 1986; 9: 101-07.
38. Frasch CE. Development of meningococcal serotyping. In: Vedros NA, editor. *Evolution of meningococcal disease*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1987. 2, p.39-53.
39. Frasch CE. Meningococcal vaccines: past, present and future. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal disease*. Chichester: Wiley; 1995. p.245-84
40. Frasch CE, van Alphen L, Holst J, Poolman JT, Rosenqvist E. Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease. In: Pollard AJ, Maiden MCJ, editors. *Methods in Molecular Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001. 66:81-107
41. Fukasawa LO, Gorla MCO, Lemos AP, Brandileone MCC, Schenkman RPF, Frasch CE, Raw I, Tanizaki MM. A 190 kDA conserved surface protein from *Neisseria meningitidis* that induces bactericidal antibodies. In: Proceedings of the 12th International Pathogenic Neisseria Conference; 2000.

42. Fukasawa LO, Gorla MCO, Lemos AP, Schenkman RPF, Brandileone MCC, Fox JW, Raw I, Frasc CE, Tanizaki MM. Immune response to native NadA from *Neisseria meningitidis* and its expression in clinical isolates in Brazil. *J Med Microbiol* 2003; 52:121-25.
43. Fusco PC, Michon F, Tai JY. Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates. *J Infect Dis* 1997; 175:364-72.
44. Genco CA, Desai PJ. Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol* 1996; 4(5): 179-84.
45. Globe MP, Robbins JB, Liu TY, Gotschlich EC, Orskov I, Orskov F. Cross-antigenicity and immunogenicity between capsular polysaccharides of group C *Neisseria meningitidis* and of *Escherichia coli* K92. *J Infect Dis* 1977; 135: 94-104.
46. Gold R, Goldschneider I, Lepow ML Draper TF, Randolph M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *N.lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* 1978; 137: 112-21.
47. Goldblatt D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 1998; 47: 563-7.
48. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969a; 129: 1307-26.
49. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* 1969b; 129: 1327-48.

50. Granoff DM, Gupta RK, Belshe RB, Anderson EL- Induction of immunological refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. *J Infect Dis* 1998; 178:870-4.
51. Griffiss JM. Mechanisms of Host Immunity. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal Disease*. Chichester: John Wiley & Sons; 1995. p.35-70
52. Gu XX, Tsai CM. Purification of rough-type lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* from cells and outer membrane vesicles in spent media. *Anal Biochem* 1991; 196: 311-8.
53. Hackett CJ. Immunologic basis of vaccine research and development *The Jordan Report* 1998; 88-90.
54. Halstensen A, Sjursen H, Vollset SE, Frøholm LO, Naess A, Matre R, et al. Serum opsonins to serogroup B meningococci in meningococcal disease. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 267-76.
55. Harthug S, Rosenqvist E, Høiby EA, Gedde-Dahl TW, Frøholm LO. Antibody response in group B meningococcal disease determined by enzyme-linked immunosorbent assay with serotype 15 outer membrane antigen. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 947-53.
56. Hetherington SV, Lepow ML. Correlation between antibody affinity and serum bactericidal activity in infants. *J Infect Dis* 1992; 165:753-6.

57. Hochstein HD. Government, U.S. quality control program for *Limulus* amoebocyte lysate and endotoxin. In: Cate J W, editor. *Bacterial endotoxins: structure, biochemical significance and detection with Limulus amoebocyte lysate test*. New York: Alan R. Liss; 1985. p.221-39.
58. Ibañez O M, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WHK, Massa M, De Franco M, et al. Genetics of acute inflammation: Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol* 1992; 22:2555-63.
59. Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 blockade of IgG-initiated lysis of *Neisseria meningitidis* is a function of antigen-binding fragment binding to the polysaccharide capsule. *J Immunol* 1991; 147:1962-7.
60. Jennings HJ, Roy R, Gamian A. Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice using an *N*-propionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Immunol* 1986; 137:1708-13.
61. Jennings MP, Srikhanta YN, Moxon RE, Kramer M, Poolman JT, Kuipers B, et al. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol* 1999; 145:3013-21.
62. Jones DM, Borrow R, Fox AJ, Gray S, Cartwright KA, Poolman JT. The lipo-oligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Pathog* 1992; 13: 219-24.

63. Kabat EA, Miller CP, Kaiser H, Foster AZ. Chemical studies on bacterial agglutination VII. A quantitative study of the type specific and group specific antibodies in antimeningococcal sera of various species and their relation to mouse protection. *J Exp Med* 1945; 81: 1-8.
64. Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Josson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1997; 25:639-47.
65. Kasper DL, Winkelhake JL, Zollinger WD, Brandt BL, Artenstein MS. Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O7:K1(L):NM and group B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 1973; 110:262-8.
66. Kleijn ED, Groot R, Labadie J, Lafeber AB, van den Dobbelen, van Alphen L, et al. Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. *Vaccine* 2000; 18:1456-66.
67. Kleijn ED, Groot R, Lafeber AB, Labadie J, van Limpt KCJP, Visser J, et al. Immunogenicity and safety of monovalent P1.7^h,4 meningococcal outer membrane vesicle vaccine in toddlers: comparison of two vaccination schedules and two vaccine formulations. *Vaccine* 2001; 19:1141-8.
68. Klein NJ, Ison CA, Peakman M, Levin M, Hammerschmidt S, Frosch M, et al. The influence of capsulation and lipo-oligosaccharide structure on neutrophil adhesion molecule expression and endothelial injury by *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1996; 173: 172-9.

69. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
70. Lehmann AK, Halstensen A, Aaberge IS, Holst J, Michaelsen TE, Sornes S, et al. Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PorA and PorB. *Infect Immun* 1999; 67: 2552-60.
71. MacDonald NE, Halperin SA, Law BJ, Forrest B, Danzing LE, Granoff DM. Induction of immunological memory by conjugated vs plain meningococcal vaccine in toddlers. *JAMA* 1998; 280: 1685-9.
72. MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Williams D, Pais L, Carlone G, et al. Immune response to revaccination with meningococcal A and C polysaccharides in Gambia children following repeated immunisation during early childhood. *Vaccine* 1999; 17: 3086-93.
73. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3140-5.
74. Mandrell RE, Zollinger WD. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection or vaccination. *Infect Immun* 1989; 57: 1590-8.
75. Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson KBJ, Harakeh HS, Dykes JK, et al. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 156-67.

76. McGee ZA, Stephens DS, Hoffman LH, Schlech WF, Horn RG. Mechanisms of mucosal invasion by pathogenic *Neisseria*. *Rev Infect Dis* 1983; 5(Suppl.4): S7: 8-14.
77. Meyer TF, Pohlner J, van Putten JPM. Biology of the pathogenic *Neisseria*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 192:283-316.
78. Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT, Melles CE, Vieira VSD, Sato H, et al. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun* 1994; 62:4419-24.
79. Milagres LG, Brandileone MCC, Sacchi CT, Vieira VSD, Zanella RC, Frasch CE. Antibody studies in mice of outer membrane antigens for use in an improved meningococcal B and C vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 13:9-17.
80. Milagres LG, Gorla MCO, 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; 66:4755-61.
81. Milagres LG, Gorla MCO, Rebelo MC, Barroso DE. Bactericidal antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup B in patients with bacterial meningitis: effect of immunization with an outer membrane protein vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28:319-27.
82. Mold C. Role of complement in host defense against bacterial infection. *Microbes Infect* 1999; 633-8.

83. Moran EE, Brandt BL, Zollinger WD. Expression of the L8 lipopolysaccharide determinant increases the sensitivity of *Neisseria meningitidis* to serum bactericidal activity. *Infect Immun* 1994; 62:5290-5.
84. Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine* 2002; 666-87.
85. Mouton D, Sant'Anna OA, Biozzi G. Multigenic control of specific and non-specific immunity in mice. A review. *Livestock Production Science* 1988; 20:277-86.
86. Mulks MH, Plaut G. IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless neisseriaceae. *N Engl J Med* 1978; 299:973-6.
87. Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, Sale J, Batista FD, Williams G, et al. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Phil Trans R Soc Lond B* 2000; 355:357-60.
88. Peeters CCAM, Rümke HC, Sundermann LC, van der Voort EMR, Meulenbelt J, Schuller M, et al. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 1996; 14:1009-5.
89. Peltola H. Meningococcal disease still with us. *Rev Infec Dis* 1984; 5:71-91.
90. Peltola H. Prophylaxis of Bacterial Meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 685-709.

91. Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, Griffiths E, Plikaytis BD, Hoiby EA, et al. immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland. *J Infect Dis* 1998; 177:683-91.
92. Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Aricó B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000; 287:1816-20.
93. Plikaytis BD, Holder PF, Carlone GM. *Program ELISA for windows user's manual*. Version 1. Atlanta: CDC; 1996.
94. Pollard AJ, Galassini R, van der Voort EMR, Booy R, Langford P, Nadel S, et al. Humoral Immune Responses to *Neisseria meningitidis* in children. *Infect Immun* 1999; 67:2441-51.
95. Pollard AJ, Frasch CE. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2001; 19:1327-46.
96. Poolman JT, van der Ley PA, Tommassen J. Surface Structures and Secreted Products of Meningococci. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal Disease*. Chichester: John Wiley & Sons; 1995. p.21-31.
97. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infect Agents Dis* 1995; 4: 13-28.
98. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381(27): 751-8.

99. Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 2001; 357: 195-6.
100. Rappuoli R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. *Vaccine* 2001; 19:2319-22.
101. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta Prevention and control of meningococcal disease. *MMWR* 2000; 49(Nº RR-7): 1-20.
102. Requejo HIZ. *Doença meningocócica – Estudo epidemiológico comparativo em nível mundial , período 1887-1997*. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1999.
103. Richmond P, Goldblatt D, Fusco PC, Fusco JDS, Hero I, Clark S, et al. Safety and immunogenicity of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine* 2000; 18:641-6.
104. Richmond P, Borrow R, Goldblatt D, Findlow J, Martin S, Morris R, et al. Ability of 3 different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose in UK toddlers. *J Infect Dis* 2001; 183:160-3.
105. Riedo FX, Plikaytis BD, Broome CV. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:643-57.

106. Romero JD, Outschoor IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: Capsular or noncapsular? *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4): 559-75.
107. Rosenqvist E, Høiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. Human Antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 1995; 63: 4642-52.
108. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 1378-88.
109. Ross SC, Rosenthal JP, Berberich HM, Densen P. Killing of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils: Implications for normal and complement-deficient individuals. *J Infect Dis* 1987; 155:1266-75.
110. Sacchi CT, Lemos APS, Whitney AM, Solari CA, Brandt ME, Melles CE, et al. Correlation between serological and sequencing analysis of the PorB outer membrane protein in the *Neisseria meningitidis* serotyping system. *Clin Diag Lab Immunol* 1998a; 5:348-54.
111. Sacchi CT, Lemos APS, Brandt ME, Whitney AM, Melles CE, Solari CA, et al. Proposed standardization of *Neisseria meningitidis* PorA variable region typing nomenclature. *Clin Diag Lab Immunol* 1998b; 5:845-55.
112. Sacchi CT, Lemos APS, Camargo MCC, Whitney AM, Melles CE, Solari CA, et al. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 4 in São Paulo, Brazil, 1990 to 1996. *Rev Inst Med Trop S.Paulo* 1998c; 40: 65-70.

113. Sacchi CT, Lemos APS, Popovic T, Moraes JC, Whitney AM, Melles CE, et al. Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: Overview and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2897-2903.
114. Sant'Anna OA, Mouton D, Ibañez OM, Bouthillier Y, Mevel JC, Reis MH, Biozzi G. Basal immunoglobulin serum concentration and isotype distribution in relation with the polygenic control of antibody responsiveness in mice. *Immunogenetics* 1985; 22: 131-9.
115. Sant'Anna OA, Bouthillier Y, Mevel JC, De Franco M, Mouton D. Isotypic distribution of antibody responses in lines of mice selected for High or Low immunoresponsiveness. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24: 407-16.
116. Sant'Anna OA, Ibañez OM, De Franco M, Massa S, Cabrera WH, Ribeiro OG, et al. Genetic control of innate and acquired immunity. *Ciência e Cult* 1994; 46: 363-7.
117. Scholten RJPM, Kuipers B, Valkenberg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by whole-cell ELISA using monoclonal antibodies and association of immunotype with serogroup, serotype and subtype. *J Med Microbiol* 1994; 41: 236-43.
118. Sherp HW, Rake G. Studies on meningococcal infection XIII. Correlation between antipolysaccharide and the antibody which protects mice against infection with type I meningococci. *J Exp Med* 1945; 81:85-92.

119. Sierra GVG, Campa HC, Varcacel NM, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991; 14:195-210.
120. Siqueira M, Brandieri A, Reis MH, Sant'Anna OA, Biozzi G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. *Eur J immunol* 1976; 6:241-9.
121. Stephens DS, Edwards KM, Morris F, McGee ZA. Pili and outer membrane appendages on *Neisseria meningitidis* in the cerebrospinal fluid of an infant. *J Infect Dis* 1982; 146:568.
122. Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 1983; 148:369-76.
123. Stephens DS, Farley MM. Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* 1991; 13:22-33.
124. Steven N, Wood M. The Clinical Spectrum of Meningococcal Disease. In: Cartwright K, editor. *Meningococcal Disease*. Chichester: John Wiley & Sons; 1995. p.177-205
125. Stojiljkovic I, Larson J, Hwa V, Anic S, So M. HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J Bacteriol* 1996; 178:4670-8.

126. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer membrane protein meningococcal vaccine. *JAMA* 1999; 281: 1520-7.
127. Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 2000; 287:1809-20.
128. Tikhomirov E, Santamaria M, Esteves K. Meningococcal disease: public health burden and control. *Wld Hlth Statist Quart* 1997; 50:170-7.
129. Twumasi PA, Kumah S, Leach A, O'Dempsey TJD, Ceesay SJ, Todd J, et al. A trial of a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in african infants. *J Infect Dis* 1995; 171:632-8.
130. Tzeng YL, Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect* 2000; 687-700.
131. US Pharmacopoeia XX. *Pyrogen Test*. The United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD; 1980. p. 902-03
132. van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun* 1991; 59: 2963-71.
133. van der Ley P, van der Biezen J, Poolman JT. Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the *porA* gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 1995; 13: 401-7.

134. Vann WF, Liu TY, Robbins JB. *Bacillus pumilus* polysaccharide cross-reactive with meningococcal group A polysaccharide. *Infect Immun* 1976; 131:1654-62.
135. Vermont CL, van Dijken HH, van Limpt CJP, de Groot R, van Alphen L, van den Dobbelsteen GPJM. Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 2002; 70: 584-90.
136. Watson RG, Scherp HW. The specific hapten of Group C meningococcus. I. Preparation and immunological behavior. *J Immunol* 1958; 81: 331-6.
137. Wedege E, Frøholm LO. Human antibody response to a group B serotype 2a meningococcal vaccine determined by immunoblotting. *Infect Immun* 1986; 51: 571-8.
138. Wedege E, Høiby EA, Rosenqvist E, Bjune G. Immune response against major membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccinees and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect Immun* 1998; 66: 3223-31.
139. West D, Reddin K, Matheson M, Health R, Funnell S, Hudson M, et al. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun* 2001; 69: 1561-7.

140. World Health Organization. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. World Health Organization Technical Report Series, no.594. Geneva, 1976.

141. Zapata GA, Vann WF, Rubinstein Y, Frasch CE. Identification of variable region differences in *Neisseria meningitidis* class 3 protein sequences among five group B serotypes. *Mol Microbiol* 1992; 6:3493-9.