

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

Curso de Especialização
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Amanda Izeli Portilho

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* POR
ANTICORPOS MONOCLONAIS NO CONTEXTO DA SAÚDE PÚBLICA**

São Paulo

2019

Amanda Izeli Portilho

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* POR
ANTICORPOS MONOCLONAIS NO CONTEXTO DA SAÚDE PÚBLICA**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz-Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientador: Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Portilho, Amanda Izeli

Avaliação de cepas de *Neisseria meningitidis* por anticorpos monoclonais no contexto da saúde pública/ Amanda Izeli Portilho– São Paulo, 2019.

47 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Imunologia e Biologia Molecular
Aplicadas a Doenças de Saúde Pública

Orientação: Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

1-*Neisseria meningitidis*; 2-Sorogrupos emergentes; 3-Anticorpos monoclonais; 4-Dot-ELISA; 5-Vigilância epidemiológica

SES/CEFOR/IAL-38/2019

*Dedico este trabalho aos meus queridos
Dora, Edson e Salete.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus;

À minha orientadora, Dra. Elizabeth De Gaspari, pela confiança, partilha e dedicação;

À Dra. Ana Paula Silva de Lemos, que gentilmente nos cedeu as cepas de bactérias e informações sobre sua sorotipagem, e ao Dr. Wendell Zollinger, que também gentilmente nos cedeu os anticorpos monoclonais utilizados neste estudo;

À Gabriela, companheira de laboratório;

À supervisora do programa de Imunologia e Biologia Molecular Aplicadas a Doenças de Saúde Pública, Gisele, bem como à comissão de ensino, especialmente Cristiane e Elaine;

Aos colegas do Centro de Imunologia;

Aos colegas da primeira turma de especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública;

A minha família, especialmente aos meus pais, Carlos e Luiza e meus irmãos, Ícaro e Mariane;

Às minhas biomédicas preferidas no mundo todo, Alaine e Naiara, e ao meu querido Willian, por toda a força e torcida;

Aos amigos do Edifício Érika, minha família em São Paulo;

Aos amigos do Centro Universitário Central Paulista e da Embrapa Pecuária Sudeste, que sempre levo em meu coração.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Superfície de <i>N. meningitidis</i> e seus antígenos..... | 14 |
| FIGURA 2 – Distribuição dos sorogrupos de meningococo e níveis de endemicidade nos países em desenvolvimento..... | 16 |
| FIGURA 3 – Fluxo da informação na rede SIREVA II..... | 18 |
| FIGURA 4 – Biogênese e motilidade do pili tipo IV..... | 22 |
| FIGURA 5 – Países com aumento na incidência de MenW na última década..... | 24 |
| FIGURA 6 – Doença meningocócica: Distribuição de sorogrupos em percentual no Estado de São Paulo..... | 25 |
| FIGURA 7 – Passos da produção de anticorpos monoclonais..... | 26 |
| FIGURA 8 – Passos da reação de <i>Immunoblotting</i> | 27 |
| FIGURA 9 – Mapa do Dot-ELISA..... | 31 |
| FIGURA 10 – Coloração das membranas de nitrocelulose por Ponceau..... | 31 |
| FIGURA 11 – Expressão de pili entre as cepas, por sorogrupo..... | 33 |
| FIGURA 12 – Expressão de imunotipo entre as cepas, por sorogrupo..... | 34 |
| FIGURA 13 – Perfil eletroforético da cepa B4:P1,15..... | 37 |
| FIGURA 14 – <i>Immunoblotting</i> da cepa B4:P1,15 e anticorpos contra pili..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – Caracterização das cepas de meningococo em sorogrupo, sorotipo e subtipo..... | 28 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anticorpos monoclonais – AcMo

BHE – Barreira hematoencefálica

DMI – Doença Meningocócica Invasiva

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fab – Fragmento de ligação do antígeno

Fc – Fragmento cristalizável

fHBP – *factor H binding protein*

GC – Gonococo

HAT – Hipoxantina-Aminopterina-Timidina

HGPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

IAL – Instituto Adolfo Lutz

kDa – kilodalton

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LPS – Lipopolissacarídeo

LOS – Lipooligossacarídeo

MC – Meningococo

MenA – Meningococo do sorogrupo A

MenB – Meningococo do sorogrupo B

MenC – Meningococo do sorogrupo C

MenW – Meningococo do sorogrupo W

MenX – Meningococo do sorogrupo X

MenY – Meningococo do sorogrupo Y

NadA – *Neisseria adhesin A*

NspA – *Neisseria surfasse protein A*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OMV – *Outer membrane vesicle*

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PNI – Programa Nacional de Imunizações

Por A – Porina A

Por B – Porina B

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIREVA – *Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonias y Meningitis Bacterianas*

SDNC – Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória

Tbp – *Transferrin binding protein*

LISTA DE SÍMBOLOS

μm – micrômetro

% – por cento

RESUMO

Neisseria meningitidis é a principal causa da meningite bacteriana no Brasil, o que a torna alvo de vigilância epidemiológica. É classificada em diferentes sorogrupos que se distribuem pelo mundo, sendo que, no Brasil, os principais sorogrupos isolados são B e C, contudo, recentemente tem sido vista a emergência do sorogrupo W. Outros países da América também reportaram aumento da doença meningocócica provocada pelos sorogrupos W e Y. O lipopolissacarídeo (LPS) e o pili tipo IV são importantes fatores de virulência para adesão às células do hospedeiro, processo indispensável para estabelecimento da doença. Foi conduzida a caracterização do pili e do LPS por meio de anticorpos monoclonais e da técnica Dot-ELISA em cepas de meningococos dos sorogrupos W e Y isoladas no Brasil entre 2014 a 2017, previamente classificadas em sorogrupo, sorotipo e subtipo. A maioria das cepas estudadas apresentou o pili tipo IV (82,45%) e o LPS 3,7,9 (98,25%). O principal intuito do trabalho foi destacar a importância da caracterização de epítomos relevantes, como o pili e o LPS, e o uso de anticorpos monoclonais, visando o apoio à vigilância epidemiológica das meningites, atentando-se sobre cepas de sorogrupos emergentes que circulam em nosso país.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*, sorogrupos emergentes, anticorpos monoclonais, Dot-ELISA, vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis is the main cause of bacterial meningitis in Brazil, which makes it the target of epidemiological surveillance. It is classified into different serogroups that are distributed throughout the world. In Brazil, the main serogroups isolated are B and C, however, the emergence of serogroup W has recently been seen. Other countries in the Americas also reported an increase in meningococcal disease caused by serogroup W, as well as by serogroup Y. The lipopolysaccharide (LPS) and type IV pili are important virulence factors for adherence to host cells, an essential process for the establishment of the disease. Characterization of pili and LPS in meningococci strains of serogroups W and Y, previously classified into serogroup, serotype and subtype, isolated in Brazil between 2014 and 2017, was conducted using the Dot-ELISA technique and monoclonal antibodies. The majority of the strains studied showed the type IV pili (82.45%) and the LPS 3,7,9 (98.25%). The main purpose of this study was to emphasize the importance of the characterizing relevant epitopes, such as pili and LPS, and the use of monoclonal antibodies, in order to support the epidemiological surveillance of meningitis, considering strains of emerging serogroups circulating in our country.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, emerging serogroups, monoclonal antibodies, Dot-ELISA, epidemiological surveillance.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1. <i>Neisseria meningitidis</i>..... | 14 |
| 1.2. Doença Meningocócica Invasiva (DMI)..... | 15 |
| 1.3. Epidemiologia da DMI..... | 16 |
| 1.4. Imunização..... | 17 |
| 1.5. Vigilância Epidemiológica..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1. Objetivos gerais..... | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 20 |
| 3. JUSTIFICATIVA (Plano Estadual da Saúde 2016-2019)..... | 20 |
| 4. REFERÊNCIAL TEÓRICO..... | 20 |
| 4.1. Antígenos de <i>Neisseria meningitidis</i>..... | 20 |
| 4.1.1. Pili..... | 21 |
| 4.1.2. Lipopolissacarídeo (LPS) | 22 |
| 4.2. Emergência dos sorogrupos W e Y de <i>Neisseria meningitidis</i>..... | 23 |
| 4.3. Anticorpos monoclonais..... | 25 |
| 4.4. Dot-ELISA e <i>Immunoblotting</i>..... | 26 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 5.1. Cepas utilizadas..... | 28 |
| 5.2. Suspensões de células íntegras..... | 30 |
| 5.3. Anticorpos monoclonais..... | 30 |

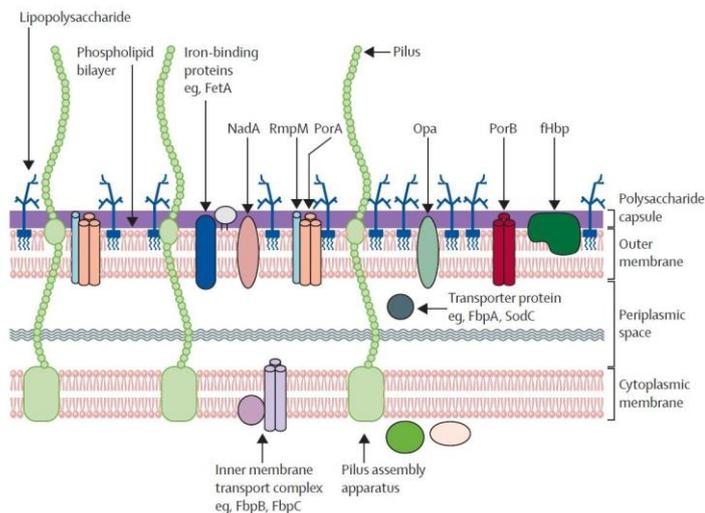
| | |
|---|-----------|
| 5.4. Dot-ELISA..... | 30 |
| 5.5. SDS-PAGE..... | 32 |
| 5.6. <i>Immunoblotting</i>..... | 32 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 6.1. Dot-ELISA..... | 32 |
| 6.2. SDS-PAGE e <i>Immunoblotting</i>..... | 37 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 39 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 40 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Neisseria meningitidis*

Neisseria é um gênero de bactérias Gram negativas que se apresentam na forma de diplococos, medem de 0,6µm a 1,5µm, são imóveis, aeróbias, não esporulam e diversas espécies fazem parte da microbiota do trato respiratório superior humano, exceto *N. gonorrhoeae*, estritamente patogênica, e *N. meningitidis*, ou meningococo, que pode colonizar a orofaringe de indivíduos saudáveis e provocar doenças invasivas como meningite e meningococcemia (LEMOS, ELIAS JUNIOR e CAMPOS, 2015). Os meningococos são classificados em sorogrupos a partir de diferenças estruturais de sua cápsula. Dentre os 12 sorogrupos conhecidos, 6 são relacionados a doença com maior frequência: A, B, C, W, X e Y (STEPHENS, GREENWOOD e BRANDTZAEG, 2007). Sua virulência é atribuída a múltiplos fatores, dentre os quais Roupael e Stephens (2012) destacam a cápsula polissacarídica, proteínas de membrana externa, como pili, porina A (porA), porina B (porB), as chamadas *Opacity proteins* Opa e Opc, o lipopolissacarídeo (LPS), mecanismos de transferência horizontal de genes e variação antigênica (figura 1).

Figura 1 - Superfície de *N. meningitidis* e seus antígenos



Fonte: Sadarangani e Pollard, 2010.

A cápsula polissacarídica é responsável por inibir a fagocitose e por regular a ativação do sistema complemento pela via alternativa (POLLARD e FRASCH, 2001). O LPS é uma estrutura imunologicamente ativa e é um dos principais responsáveis

por induzir inflamação em infecções por bactérias Gram-negativas (MANDRELL e ZOLLINGER, 1977; SPRONG et al., 2001). O pili promove adesão entre a bactéria e as células do hospedeiro, motilidade e medeia a troca de DNA por transformação (TZENG e STEPHENS, 2000; WEYAND et al., 2013). As porinas realizam trocas iônicas entre a bactéria e o meio (MASSARI et al., 2003). Diferentes proteínas estão envolvidas no sequestro de ferro do hospedeiro, indispensável para sobrevivência da bactéria, como as *Transferrin binding proteins* (TbpA e TbpB). Os antígenos *Neisseria Adhesin A* (NadA), Opa e Opc contribuem para adesão e invasão (FEAVERS e PIZZA, 2009). Os antígenos *factor H binding protein* (fHbp) e *Neisseria Surface Protein A* (NspA) inibem a ativação do sistema complemento pela via alternativa (SCARSELLI et al., 2009; LEWIS, CARTER e RAM, 2012). Em Nassif et al. (1993) está descrito como a variação antigênica é importante para escape do sistema imune e Sultan et al. (2018) expõem a transferência horizontal de genes, que acontece por conjugação, transformação ou transdução e contribui para que a bactéria adquira novas capacidades metabólicas e se adapte ao ambiente.

1.2. Doença meningocócica invasiva (DMI)

A DMI é considerada um problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Estima-se que, anualmente, existam 1,2 milhões de novos casos e 135 mil óbitos no mundo (JAFRI et al., 2013). Atribui-se a primeira descrição da enfermidade a Yieusseux, na Suíça, em 1805, enquanto o meningococo foi isolado e cultivado pela primeira vez em 1887, por Weichselbaum. No século XX, o patógeno desencadeou diversas epidemias e surtos no mundo (WILHELM e VILLENA, 2012).

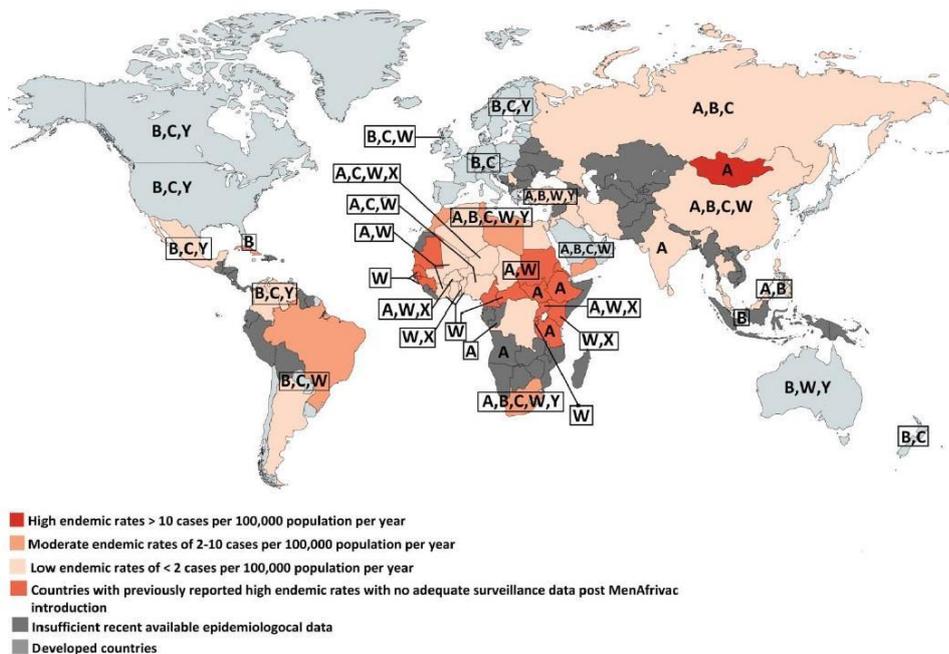
A transmissão se dá pelo contato pessoa a pessoa ou com secreções respiratórias de indivíduos doentes (o grupo de maior risco é o de menores de 1 ano) ou portadores saudáveis do meningococo (MC), sendo que os principais portadores são adolescentes e jovens adultos. O período de incubação média é de 3-4 dias e pode se estender a até 10 dias. Com a nasofaringe colonizada, a progressão para doença invasiva dependerá da virulência da cepa e do sistema imune do hospedeiro. Se não tratada, a infecção pode evoluir para choque, falência múltipla dos órgãos e óbito em até 24 horas. Os sintomas são febre, sonolência,

náusea, vômitos, rigidez e dor na nuca e *rash* púrpurico. O tratamento exige internação e antibioticoterapia endovenosa. As cefalosporinas de terceira geração são a primeira opção de tratamento, seguidas pela penicilina ou ampicilina. Devido aos altos índices de mortalidade e morbidade relacionados à DMI, o tratamento é iniciado antes mesmo da confirmação laboratorial, feita por exame quimiocitológico, bacterioscopia e cultura do líquido céfalo-raquidiano (LCR), hemocultura, prova de aglutinação do látex e PCR em tempo real de soro e LCR (BRANCO, AMORETTI e TASKER, 2007; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE-SC, 2014).

1.3. Epidemiologia da DMI

Para a OMS, não há estimativa exata sobre o impacto da DMI devido à falta de sistemas de vigilância adequados em muitos países, todavia, concorda-se que a prevenção tem se mostrado uma boa estratégia para controle (BORROW et al., 2017). Shaker, Fayad e Dbaibo (2018) reforçam que o impacto da DMI é maior em países em desenvolvimento. A distribuição dos sorogrupos e o impacto da doença pelo mundo são heterogêneos, como visto na figura 2.

Figura 2 - Distribuição dos sorogrupos de meningococo e níveis de endemidade nos países em desenvolvimento.



Fonte: Shaker, Fayad e Dbaibo, 2018.

Aguilera et al. (2002) reportam surtos de impacto internacional, ocorridos durante o Hajj, peregrinação islâmica a Mecca. O primeiro, atribuído a MenA, ocorreu em 1987 e provou a capacidade de transmissão do MC, especialmente em situações de aglomeração. Em 1992, aconteceu outro surto pelo mesmo sorogrupo, contudo, não foram registrados casos fora da Arábia Saudita. Já o Hajj de 2000 tornou-se conhecido pela ascensão do sorogrupo W-135 e os casos se espalharam por Estados Unidos, países do norte africano, Oriente Médio e Ásia.

Em estudo retrospectivo sobre o Brasil, Moraes e Barata (2005) indicam de 1920 a 1926 como primeiro período epidêmico, de prevalência dos sorogrupos A e C. Entre 1945 e 1952 viu-se nova epidemia do sorogrupo A. Já em 1971, teve início a epidemia do sorogrupo C que, em 1974, foi sobreposta por MenA.

1.4. Imunização

As primeiras vacinas foram desenvolvidas na década de 1970 e eram polissacarídicas (COORDENAÇÃO GERAL DO PROGRAMA DE IMUNIZAÇÕES, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE PARA AS AMÉRICAS, 2002). Na década de 80 surgiram as vacinas conjugadas de polissacarídeos MC aos toxoides diftérico ou tetânico, as quais podem ser tetravalentes para os sorogrupos A, C, W e Y (SÁFADI e BARROS, 2006). A cápsula de MenB, formada pelo ácido a-2-8-N-acetilneuroamínico, mimetiza o tecido neurológico humano e vacinas com seu polissacarídeo provocariam auto-imunidade, logo, sua imunização conta com as OMVs (proteínas de membrana externa) (GIULIANI et. al., 2006; GROGAN e ROOS, 2017).

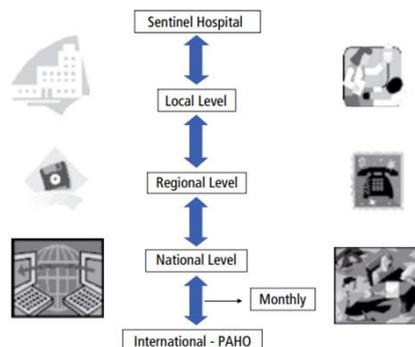
As vacinas polissacarídicas são de imunização T independente. Seu uso não é indicado para menores de 2 anos, não confere imunidade de memória e a população vacinada não apresenta redução da colonização por *N. meningitidis*. As vacinas de composição proteica promovem resposta timo dependente e conferem imunidade a menores de 2 anos, memória imunológica e diminuição do estado de portador da bactéria (MESQUITA JÚNIOR, 2010; SHAKER, FAYAD e DBAIBO, 2018). A análise de vacinas leva em consideração: capacidade de iniciar a resposta imune, proteção efetiva da resposta, indução de memória imunológica e promoção da imunidade de rebanho, que protege indivíduos suscetíveis não vacinados devido

à diminuição da bactéria entre os portadores (BORROW et al., 2013). Portanto, as vacinas conjugadas e recombinantes tornam-se mais interessantes (SÁFADI, 2006).

1.5. Vigilância epidemiológica

Em 1975 foi formalizado no Brasil o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica e, no ano seguinte, as meningites foram vinculadas a ele. O Sistema de Informação de Doenças de Notificação Compulsória (SDNC) fornecia dados de distribuição e tendência de uma série de enfermidades e permitia conhecer os patógenos circulantes, prever surtos e traçar as melhores iniciativas de controle (TEIXEIRA, 1998). Já em 1993 foi implantado o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), que hoje é a principal base de registro de doenças de notificação (LAGUARDIA et al., 2004). Atualmente, o país participa do SIREVA II (*Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Responsables de Neumonias y Meningitis Bacterianas*), rede latino-americana coordenada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que integra a *Global Invasive Bacterial Vaccine Preventable Disease* da Organização Mundial da Saúde (OMS). Cepas de MC isoladas de pacientes com DMI são encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz Central e é realizada a caracterização fenotípica e molecular das mesmas, a fim de gerar informações que colaboram com a vigilância a níveis local, regional, nacional e internacional (figura 3) (BRASIL, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2017; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Figura 3 - Fluxo da informação na rede SIREVA II



Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde, 2010.

A vigilância adequada é de suma importância para estimar o impacto da DMI, traçar estratégias de prevenção e avaliar os sistemas disponíveis de diagnóstico e monitoramento (SHAKER, FAYAD e DBAIBO, 2018). Barreto et al. (2011) consideram que o controle das meningites tornou-se eficaz ao longo dos anos, salientam a contribuição da OPAS para o alcance desse resultado e ressaltam a importância da pesquisa epidemiológica no país.

Segundo o último volume do Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2017), a DMI é endêmica, com surtos esporádicos no Brasil e incidência de menos de um caso por 100.000 habitantes de 2014 a 2016. O principal agente causador da enfermidade é o MC, a letalidade da doença está na faixa de 20%, subindo para 50% nos casos de meningococemia e, desde 2010, a vacina meningocócica C conjugada está disponível no Programa Nacional de Imunizações (PNI). Os objetivos da vigilância epidemiológica da DMI no país são monitorar a situação epidemiológica da doença, disseminar informações coletadas, avaliar medidas de controle, detectar surtos de modo precoce, monitorar os sorogrupos prevalentes e o perfil de resistência das cepas. Ao caracterizar as cepas, se conhece seu potencial patogênico, já que alguns antígenos são importantes para virulência (FRASCH, ZOLLINGER e POOLMAN, 1985). O LPS e o pili são importantes para adesão e invasão ao tecido do hospedeiro, processos fundamentais para o estabelecimento da doença, entre outras características que acentuam a patogenicidade da bactéria (TZEG e STEPHENS, 2000; STEPHENS, 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Caracterizar cepas de *N. meningitidis* dos sorogrupos W e Y isoladas no Brasil, de 2014 a 2017, por anticorpos monoclonais.

2.2. Objetivos específicos

Caracterizar o pili e LPS de 57 cepas brasileiras de meningococo isoladas de pacientes com doença invasiva entre 2014 e 2017 utilizando-se a técnica Dot-ELISA e o anticorpos monoclonais;

Verificar, por *Immunoblotting*, a especificidade dos anticorpos monoclonais para pili e a expressão do antígeno pela cepa B:4.P1,15 cultivada em diferentes meios de cultura;

Discutir a importância da caracterização de cepas circulantes dos sorogrupos W e Y dentro das ações de vigilância da DMI.

3. Justificativa (Plano Estadual de Saúde 2016-2019)

A caracterização de cepas circulantes de *N. meningitidis* contribui para a vigilância epidemiológica, permitindo-se conhecer os fatores de virulência do patógeno e, conseqüentemente, sua capacidade de provocar doença. Além disso, o monitoramento de antígenos colabora para pesquisa de diferentes formulações antigênicas e avaliação do impacto de vacinas já disponíveis para imunização. Dada a recente emergência dos sorogrupos W e Y a importância do pili para virulência do meningococo, é importante o avaliar em cepas circulantes no país, com o objetivo de contribuir com o sistema de vigilância epidemiológica sobre a DMI.

4. Referencial Teórico

4.1. Antígenos de *Neisseria meningitidis*

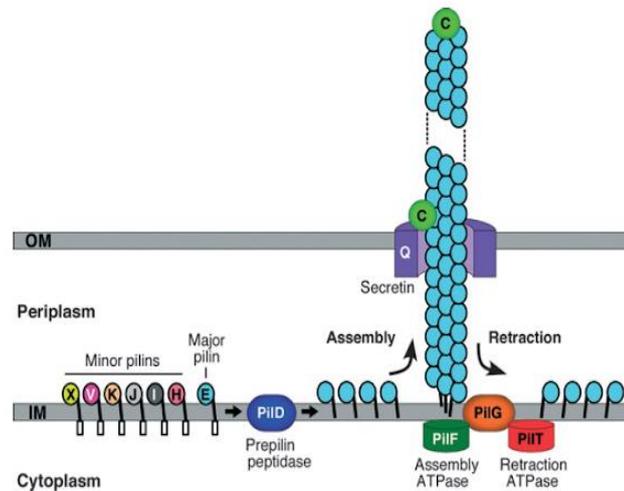
A sorotipagem de *N. meningitidis* por um painel de anticorpos monoclonais (AcMo) utiliza a cápsula polissacarídica, PorB e PorA para classificar as cepas em sorogrupo, sorotipo e subtipo, respectivamente. AcMo que reconhecem o LPS podem ser empregados para classificação da bactéria em imunotipos. A caracterização leva em conta antígenos importantes para a bactéria e, logo, para a vigilância epidemiológica (FRASCH, ZOLLINGER e POOLMAN, 1985; ABDILLAHI e POOLMAN, 1987).

4.1.1. Pili

O pili é uma organela proteica responsável pela primeira interação entre a bactéria e as células do hospedeiro, além de atuar na motilidade (TZENG e STEPHENS, 2000), mediar a troca de DNA por transformação (WEYAND et al., 2013) e contribuir para que o patógeno atravesse a barreira hematoencefálica (BHE) (COUREUIL et al., 2009). Na literatura, é descrito que o pili se forma por um arranjo de subunidades que pode apresentar pequenas variações. Seu peso molecular encontra-se na faixa de 17 a 22 kDa para gonococo (GC) e 17 a 21 kDa para MC (HECKLES, 1989). Atualmente são conhecidas duas classes principais de pili de MC: Classe I, muito similar ao pili de *N. gonorrhoeae* e Classe II, todavia, um estudo com células endoteliais de veia umbilical humana avaliou que a eficiência na adesão de ambos os tipos é similar (VIRJI et al., 1991; AHO et al., 1997). Os pilis de Classe I e II são da família do pili tipo IV, encontrado em outras bactérias patogênicas Gram negativas e favorece a adesão, motilidade, formação de microcolônias e biofilmes e transferência de DNA, processos que acentuam a virulência do patógeno (TZENG e STEPHENS, 2000; ERIKSSON et al., 2015). O pili tipo IV interage com os receptores celulares CD147, permitindo a adesão da bactéria, e com o receptor β 2 adrenérgico, induzindo sinalização que culmina com perturbação da BHE e invasão do meningococo ao sistema nervoso central (KOLAPPAN et al., 2016).

Em sua biogênese, uma vez sintetizado e translocado pelo citoplasma, o pili tipo IV é clivado pela PilD peptidase. Então, o componente maior, PilE, atravessa a membrana através de um poro composto pela PilQ secretina. Três proteínas, PilV, PilX e ComP, os pili menores, compartilham com o PilE a faixa de peso molecular de 15 a 20 kDa (IMHAUS e DUMÉNIL, 2014). Hélaine et al. (2007) sugerem que os componentes menores contribuem para a ação da organela. A proteína PilC encontra-se na extremidade de PilE, tem papel de adesina e, junto de PilT, coordena a motilidade (LEMOS, ELIAS JUNIOR e CAMPOS, 2008). Os componentes menores e o componente maior são ancorados na membrana interna. O componente maior é clivado por PilD e o pili maduro é montado e exposto na membrana externa através de PilQ. PilF é a ATPase responsável pela síntese de energia para o processo de montagem e movimentação, que consiste em retração, na qual o pili é desmontado, seguida pela expansão, na qual se recompõe (THANASSI, BLISKA e CHRISTIE, 2012). A figura 4 ilustra a biogênese do pili.

Figura 4 - Biogênese e motilidade do pili tipo IV



Fonte: Thanassi, Bliska e Christie, 2012.

Os antígenos das espécies patogênicas de *Neisseria* apresentam variabilidade entre cepas (JOHNSTON, HOLMES e GOTSCHLICH, 1976). Todavia, o estudo de Cannon et al. (1984) mostrou reatividade cruzada do AcMo H8 de GC frente 25 cepas patogênicas de MC de diferentes sorogrupos. Virji e Heckles (1983) descreveram reatividade cruzada entre os anticorpos monoclonais SM1, SM2 e SM11, induzidos por cepa de GC, e MC isolado de casos clínicos. Diáz, Virji e Heckles (1984), ao estudar 11 cepas piliadas de MC, conforme visto em microscopia eletrônica, observaram que cinco destas não foram reconhecidas pelos anticorpos SM1 e SM2. Stephens et al. (1988) verificaram que determinados epítomos de pili eram conservados em cepas de MC após passagens por cultura de células de nasofaringe humana e demonstraram reatividade cruzada entre anticorpos induzidos a partir de cepas de GC e isolados de MC. Tais estudos sugerem que epítomos importantes devem ser mantidos e compartilhados entre cepas.

4.1.2. Lipopolissacarídeo (LPS)

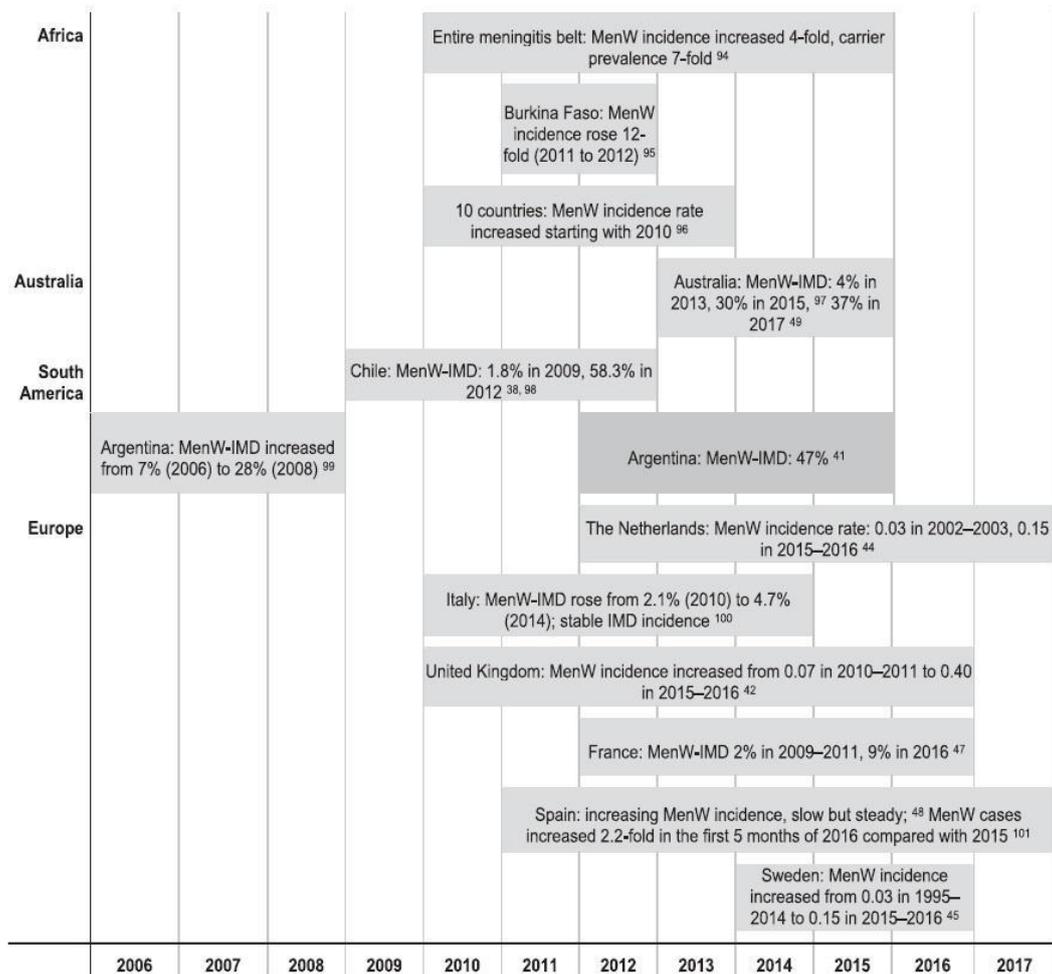
O LPS é considerado o principal fator de virulência das bactérias Gram negativas e induz reações inflamatórias em hospedeiros. É constituído por um polissacarídeo central, o lipídio A, responsável pela toxicidade da molécula, e o antígeno O. Nas espécies de *Neisseria*, essa molécula não possui cadeias laterais repetitivas junto ao antígeno O, que é constituído por um oligossacarídeo simples,

logo, esta estrutura é denominada lipo-oligossacarídeo, ou LOS (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2009; LEMOS, ELIAS JUNIOR e CAMPOS, 2015). O LOS contribui para adesão e invasão, ativa o sistema imunológico, promovendo a ativação da resposta inata, sofre variação antigênica e contribui com a sobrevivência do patógeno atuando na inibição da fagocitose e da ativação do sistema complemento. As diferenças antigênicas do LOS caracterizam o MC em imunotipos (KAHLER e STEPHENS, 1998; STEPHENS, 2009). Estudos demonstram que alguns imunotipos são mais frequentes em DMI, enquanto outros estão relacionados a cepas de portadores (JONES et al, 1992; RAM et al., 1999). O arranjo do LOS na superfície da célula também influencia a exposição de proteínas de membrana externa, o que tem implicações na dinâmica patógeno-hospedeiro (POOLMAN et al., 1985).

4.2. Emergência dos sorogrupos W e Y de *Neisseria meningitidis*

Nas últimas duas décadas, a incidência dos sorogrupos W e Y aumentou, especialmente na Inglaterra e nas América (LUCIDARME et al., 2015). Borrow et al. (2017) reúne dados que apontam para esta emergência, citando, entre outros, o clone hipervirulento W:2a:P1.5,2:ST-11, que surgiu no Brasil há cerca de dez anos, e o aumento de MenW em outros países, como Argentina e Chile e existe preocupação sobre a capacidade de troca de cápsula deste sorogrupo. Na revisão de Booy et al. (2018), também é citada elevação na incidência do sorogrupo no Paraguai e no Uruguai entre 2008 e 2009. A figura 5 mostra a elevação do sorogrupo em diversos países.

Figura 5 - Países com aumento na incidência de MenW na última década



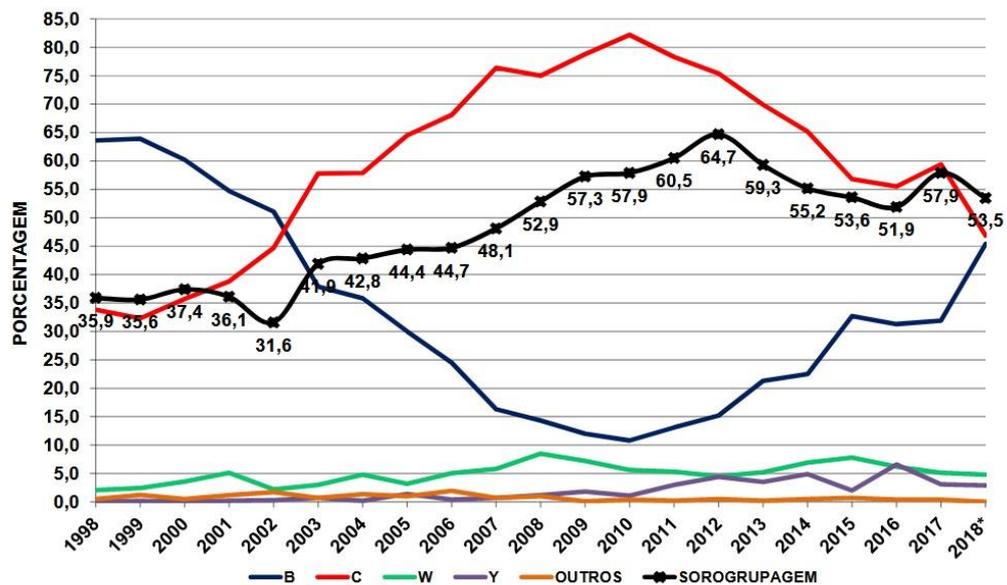
Índice por 100.000 habitantes. Fonte: Booy et al., 2018.

Recentemente, alguns trabalhos também pontuaram aumento na incidência de MenY nos Estados Unidos (ROSENSTEIN et al., 1999), no Canadá (TSANG et al., 2007) e na Colômbia (AGUDELO, SANABRIA e OVALLE, 2008). Na Europa, a elevação na incidência desse sorogrupo foi vista especialmente em países da região Norte e Central (BRÖKER, 2012). Peterson et al. (2018) seleciona diversos trabalhos sobre portadores, nos quais é observada alta presença de MenY entre estudantes universitários e militares dos Estados Unidos e na população europeia.

No Brasil, o primeiro caso de DMI pelo sorogrupo W foi descrito em 1983, no estado de São Paulo, entretanto, a prevalência do sorogrupo permaneceu baixa até os anos 2000, quando se viu elevação da circulação do sorogrupo (BARROSO e

REBELO, 2007; WEIDLICH et al., 2008; LEMOS et al., 2010). A figura 6 mostra a distribuição de sorogrupos de MC em São Paulo nos últimos dez anos.

Figura 6 - Doença meningocócica: Distribuição de sorogrupos em percentual no Estado de São Paulo



Fonte: SINAN, DDTR, CVE, CCD, SES-SP, 2019.

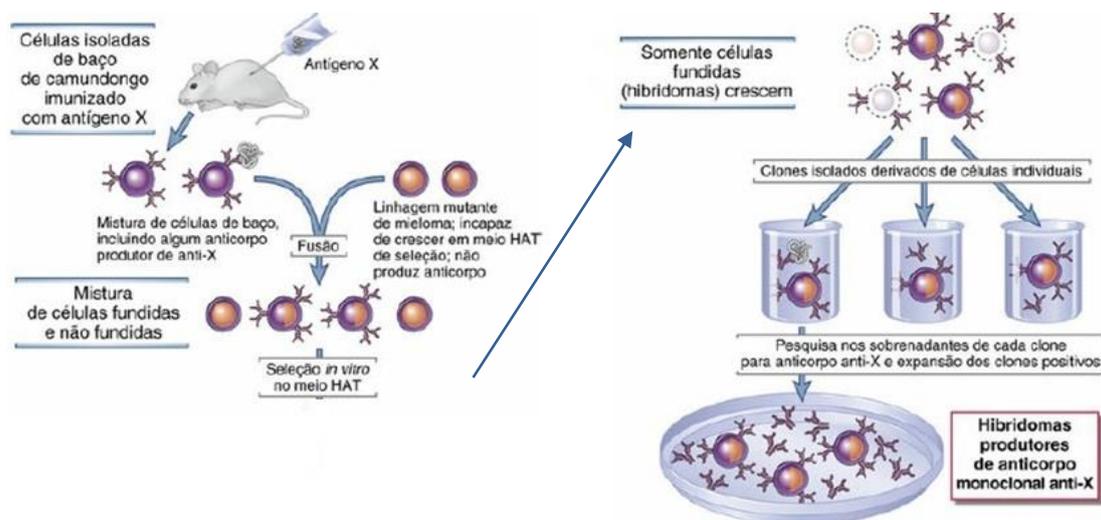
Segundo Hedberg et al. (2011), a emergência de sorogrupos, apesar de multicausal, deve-se especialmente ao surgimento de clones com elevada patogenicidade. Sendo assim, é de extrema importância caracterizar tais sorogrupos para melhorar a vigilância sobre o patógeno.

4.3. Anticorpos monoclonais (AcMo)

A técnica de produção de AcMo, combinando os núcleos de linfócitos B de animais imunizados ao de células tumorais de mieloma, permitiu a produção de anticorpos dirigidos a um epítipo determinado, aumentando sua especificidade, foi desenvolvida em 1975 por Köhler e Milstein (GODING, 1996). A produção consiste na imunização de animais com o antígeno e fusão das células do baço do animal a células de mieloma imortalizadas e deficientes de enzimas, na presença de polietilenoglicol, que diminui a tensão superficial das membranas e propicia a fusão celular. O meio Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT) é utilizado para o cultivo porque seleciona apenas células híbridas devido à síntese de purinas: as células

podem sintetizar purinas pela via do tetraidofolato ou pela via da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT). As células de mieloma são deficientes da enzima HGPRT e a aminopterina inibe a produção do tetraidofolato, portanto, ambas as vias de purinas são prejudicadas, impossibilitando a sobrevivência das células de mieloma. Os linfócitos B envelhecem e sofrem apoptose. Apenas as células híbridas, ou hibridomas, que recebem a HGPRT dos esplenócitos, sobrevivem e herdam a capacidade de proliferação dos mielócitos. São realizadas, então, diluições limitantes para isolar as células, de forma que se tenha um único clone por poço, que sofrerá expansão e produzirá anticorpos com alta especificidade (figura 7). (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015; RIBATTI, 2014 RIBATTI, D).

Figura 7 - Passos da produção de anticorpos monoclonais



Fonte: Abbas, Lichtman e Pillai, 2015, adaptado pelo autor.

Os AcMo podem ser aplicados em imunoenaios, como ELISA, *Immunoblotting*, imuno-histoquímica, entre outros, para detecção de diversos alvos, como proteínas, imunoglobulinas, hormônios, etc (BYRNE et al., 2009).

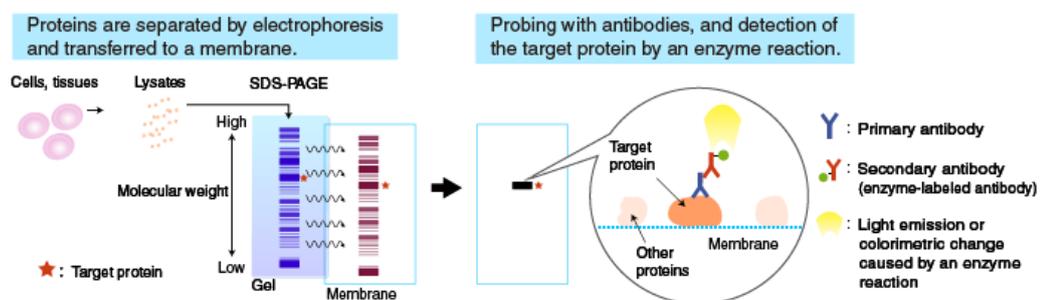
4.4. Dot-ELISA e *Immunoblotting*

Blotting é o processo de transferir macromoléculas para uma matriz imobilizante, como membranas de nitrocelulose ou PVDF, técnica que tem sido aprimorada e utilizada para diversos estudos (GERSHONI e PALADE, 1983).

Southern blotting e *Northern blotting*, utilizados para análise de ácidos nucleicos e *Western blotting*, para análise de proteínas, são exemplos de metodologias que combinam a separação da amostra em corrida eletroforética e posterior transferência para a membrana (STOTT, 1989).

O Dot-ELISA consiste em aplicar o antígeno em solução diretamente sobre a membrana, logo, este mantém sua estrutura nativa, enquanto, na técnica de *Immunoblotting*, o antígeno será submetido à separação por corrida de eletroforese, ou seja, não estará mais na mesma conformação estrutural inicial. A revelação do antígeno, em ambos os casos, é feita pela utilização de dois AcMo: um primeiro se liga ao antígeno, e um segundo, conjugado a um cromógeno, se liga ao primeiro anticorpo. Ao se adicionar o substrato para o cromógeno, haverá formação de cor (figura 8) (HAWKES, NIDAY e GORDON, 1982; STOTT, 1989). Existem diferentes cromógenos que variam conforme sua sensibilidade. Ni, Xu e Gallagher (2016), sugerem BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium*), altamente sensível, para AcMo conjugados à fosfatase e, para conjugados à peroxidase, 4CN (4-cloro-1-naftol) e DAB (diaminobenzidina), respectivamente de baixa e intermediária sensibilidade.

Figura 8 - Passos da reação de *Western-blotting* e revelação por *Immunoblotting*



Fonte: MBL Life Science.

A tipagem de cepas de *N. meningitidis* por Dot-ELISA e um painel de anticorpos monoclonais está bem estabelecida, tendo como vantagens a simplicidade da técnica, que dispensa uso de equipamentos específicos, utiliza pouco volume de anticorpos monoclonais, requer pouca manipulação de amostras, é rápida, reprodutível e pode ser aplicada em larga escala (WEDEGE, 1990).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Cepas utilizadas

Foram utilizadas 57 cepas de MC brasileiras, isoladas de pacientes com DMI, entre 2014 e 2017, sendo 35 de MenW e 22 de MenY. As cepas foram sorogrupadas, sorotipadas e subtipadas por AcMo no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e esta caracterização encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização das cepas de meningococo em sorogrupo, sorotipo e subtipo

| Nº de IAL | Ano | UF | Identificação | Sorogrupo | Sorotipo | Subtipo |
|-----------------|------|----|-----------------------|-----------|----------|---------|
| N.13/14 | 2014 | BA | <i>N.meningitidis</i> | W | 2b | P1.5,2 |
| N.111/14 | 2014 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | NT | P1.5,2 |
| N.146/14 | 2014 | MG | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.249/14 | 2014 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 22 | nt |
| N.305/14 | 2014 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 22 | nt |
| N.327/14 | 2014 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | nt |
| N.341/14 | 2014 | RS | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5 |
| N.385/14 | 2014 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 19,10 | nt |
| N.51/15 | 2015 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 22 | nt |
| N.78/15 | 2015 | PR | <i>N.meningitidis</i> | W | 23 | P1.3 |
| N.127/15 | 2015 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2b | nt |
| N.170/15 | 2015 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.262/15 | 2015 | CE | <i>N.meningitidis</i> | Y | 19 | P1.10 |
| N.268/15 | 2015 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 22 | P1.3 |
| N.15/16 | 2016 | PR | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.25/16 | 2016 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 2b | P1.5,2 |
| N.71/16 | 2016 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.226/16 | 2016 | PR | <i>N.meningitidis</i> | Y | 4 | nt |
| N.239/16 | 2016 | RS | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.250/16 | 2016 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 2b | P1.5,2 |
| N.5/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.21/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |

| | | | | | | |
|-----------------|------|----|-----------------------|---|-------|--------|
| N.29/17 | 2017 | MG | <i>N.meningitidis</i> | Y | 4 | nt |
| N.38/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | NT | nt |
| N.52/17 | 2017 | MG | <i>N.meningitidis</i> | Y | 4 | nt |
| N.55/17 | 2017 | MG | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | nt |
| N.57/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.58/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.73/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.85/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | Y | 19,10 | nt |
| N.87/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.100/17 | 2017 | PR | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.5,2 |
| N.129/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 19 | nt |
| N.132/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.136/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | NT | P1.2 |
| N.140/17 | 2017 | PE | <i>N.meningitidis</i> | W | NT | P1.2 |
| N.147/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2b | P1.2 |
| N.149/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 2a | nt |
| N.151/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 2a | nt |
| N.158/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.159/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.160/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.168/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2b | P1.2 |
| N.169/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.170/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | Y | 19,10 | P1.3 |
| N.172/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2b | P1.2 |
| N.178/17 | 2017 | DF | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.190/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2b | nt |
| N.200/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | Y | 4 | nt |
| N.205/17 | 2017 | RS | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.206/17 | 2017 | RS | <i>N.meningitidis</i> | Y | 2c | P1.5 |
| N.208/17 | 2017 | MG | <i>N.meningitidis</i> | W | NT | P1.3 |
| N.236/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | Y | 22 | nt |
| N.243/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |
| N.250/17 | 2017 | RS | <i>N.meningitidis</i> | W | 2a | P1.2 |

| | | | | | | |
|-----------------|------|----|-----------------------|---|----|------|
| N.262/17 | 2017 | SC | <i>N.meningitidis</i> | Y | 22 | nt |
| N.263/17 | 2017 | SP | <i>N.meningitidis</i> | W | NT | P1.2 |

Fonte: Informações recebidas do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, tabela elaborada pelo autor.

5.2. Suspensões de células íntegras

As suspensões de células íntegras e inativadas, bem como as informações dispostas na tabela 1, foram gentilmente cedidas pela Dr. Ana Paula Silva Lemos, do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. As suspensões de células íntegras e inativadas são armazenadas em tubos identificados pelo número de IAL e conservadas em geladeira (4°C).

5.3. Anticorpos monoclonais

Todos os AcMo foram gentilmente cedidos pelo Dr. Wendell Zoolinger, do Walter Reed Army Institute of Research (Estados Unidos). Os anticorpos para reconhecimento de pili são 1E2-12H2 (pili de GC), 7BE211-E12 (pili tipo IV) e 8D11-11 (pili de GC). Os anticorpos que reconhecem o LOS são WBE12-L10 (L3,7,9), 3G3-1-8C (L1), 6E7-10 (L8) e 5B4-F10 (L10).

5.4. Dot-ELISA

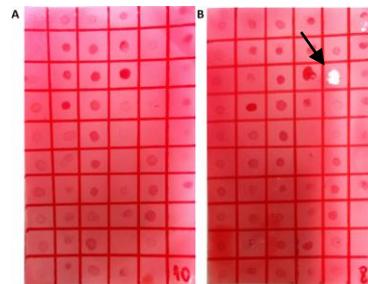
Para realização do DOT-ELISA foram utilizadas membranas de nitrocelulose de 0,45µm (BioRad Laboratories), cortadas na dimensão de 5cmx3cm e quadriculadas na dimensão de 0,5cmx0,5cm. Em cada quadrado foi pipetado 1µL de suspensão de células íntegras de determinada cepa e todas as membranas foram identificadas (figura 9).

Figura 9 - Mapa do Dot-ELISA

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A | N13/14 | N.5/17 | N.140/17 | N.205/17 | N262/15 | N.149/17 |
| B | N146/14 | N.21/17 | N.147/17 | N.208/17 | N268/15 | N.151/17 |
| C | N327/14 | N.55/17 | N.158/17 | N.243/17 | N25/16 | N.170/17 |
| D | N341/14 | N.57/17 | N.159/17 | N.250/17 | N226/16 | N.200/17 |
| E | N78/15 | N.58/17 | N.160/17 | N.263/17 | N250/16 | N.206/17 |
| F | N127/15 | N.73/17 | N.168/17 | N111/14 | N.29/17 | N.236/17 |
| G | N170/15 | N.87/17 | N.169/17 | N249/14 | N.38/17 | N.262/17 |
| H | N15/16 | N.100/17 | N.172/17 | N305/14 | N.52/17 | |
| I | N71/16 | N.132/17 | N.178/17 | N385/14 | N.85/17 | |
| J | N239/16 | N.136/17 | N.190/17 | N51/15 | N.129/17 | Id. |

De A1 a E4 foram aplicadas as cepas de MenW, e F4 a G6 foram aplicadas as cepas de MenY. Os campos H6 e I6 não foram utilizados e em J6 foi feita a identificação das membranas. Fonte: elaborada pelo autor, 2018.

Após a aplicação das suspensões de células íntegras, as membranas foram secas em temperatura ambiente por 30 minutos. Para avaliar a qualidade das membranas, todas foram coradas com 1mL de corante reversível vermelho de Ponceau, conforme visto na figura 10.

Figura 10 - Coloração das membranas de nitrocelulose por Ponceau

(A) Membrana adequada e (B) Membrana descartada, devido a defeito na nitrocelulose (área não corada). Fonte: elaborada pelo autor, 2018.

Em seguida, o corante foi retirado lavando-se as membranas em água destilada e, em seguida, em PBS pH 7,2 1x. Para prosseguir o ensaio, as membranas foram bloqueadas com solução PBS-leite 5% (La Sereníssima) por 2 horas, em temperatura ambiente, em agitação. A seguir, os anticorpos foram diluídos a 1:2000 em PBS-leite 2,5% e foram incubados *overnight* a 4°C. As membranas foram lavadas 5 vezes com PBS e então, adicionou-se o conjugado *Anti-mouse IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase* (Sigma Aldrich) diluído a 1:5000 em PBS-leite 2,5% por 2 horas, em temperatura ambiente e em agitação. Após, as membranas foram lavadas novamente com PBS e incubadas com o

substrato BCIP/NBT-*plus* (Mabtech) por 20 minutos a temperatura ambiente, em abrigo da luz. A reação foi parada com água destilada. As membranas foram devidamente guardadas. A reação foi procedida igualmente para cada AcMo monoclonal utilizado no estudo.

5.5. SDS-PAGE

A cepa B4:P1,15, estudada em nosso laboratório, foi caracterizada por SDS-PAGE e utilizada para a reação de *Immunoblotting*. Amostras de OMVs e de suspensões de células íntegras crescidas em ágar Müller-Hinton e meio de cultivo Catlin da cepa foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), conforme descrito por Laemmli (1970), junto de padrão de peso molecular de 11 a 245 kDa (Color Protein Standard Broad Range, New England BioLabs). Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue (PhastGel® Blue R, Pharmacia Biotech) e descorado com ácido acético 7% até que as bandas fossem visíveis.

5.6. Immunoblotting

Após a corrida eletroforética, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose 0.45µm (BioRad Laboratories) a 100 V por 18 horas a 4°C. As membranas foram bloqueadas com PBS-leite 5% (La Sereníssima) por 2 horas, em temperatura ambiente e em agitação. Posteriormente, foram incubadas *overnight* a 4°C com os AcMo diluídos a 1:2000 em PBS-leite 2,5%. Então, as membranas foram lavadas 5 vezes com PBS e adicionou-se o conjugado *Anti-mouse IgG (whole molecule)-Alkaline Phosphatase* (Sigma Aldrich) diluído a 1:5000 em PBS-leite 2,5%, o qual foi incubado por 2 horas, em temperatura ambiente e em agitação. As membranas foram lavadas novamente com PBS e foi adicionado o substrato filtrado BCIP/NBT-*plus* (Mabtech), o qual reagiu por 20 minutos à temperatura ambiente, em abrigo da luz. A reação foi parada com água destilada e as membranas foram devidamente guardadas.

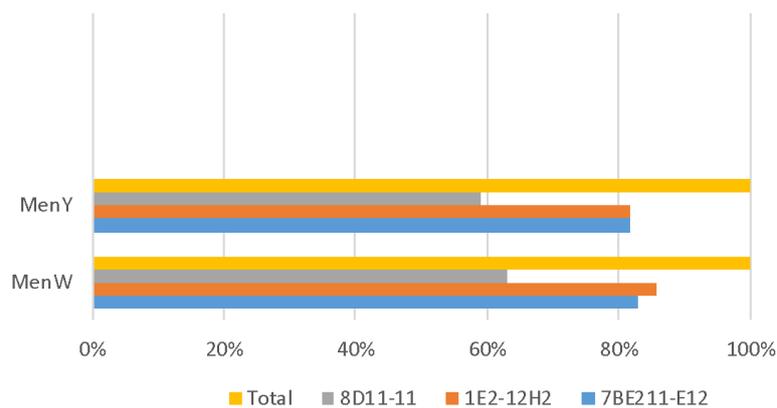
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Dot-ELISA

Dentre as 57 cepas utilizadas, 48 foram reconhecidas por algum dos AcMo para pili utilizados, sendo que 31 cepas foram reconhecidas pelos três anticorpos de pili. O reconhecimento das cepas por mais de um AcMo já era esperado, já que o pili forma-se pela associação de várias proteínas (HUNG e CHRISTODOULIDES, 2013), o que implica na expressão de diferentes epítomos que podem ser alvos de anticorpos.

A figura 11 apresenta a expressão dos tipos de pili em cada sorogrupo. 7BE211-E12 refere-se ao pili tipo IV, enquanto 1E2-12H2 e 8D11-11 revelam similaridades entre o pili de GC e MC.

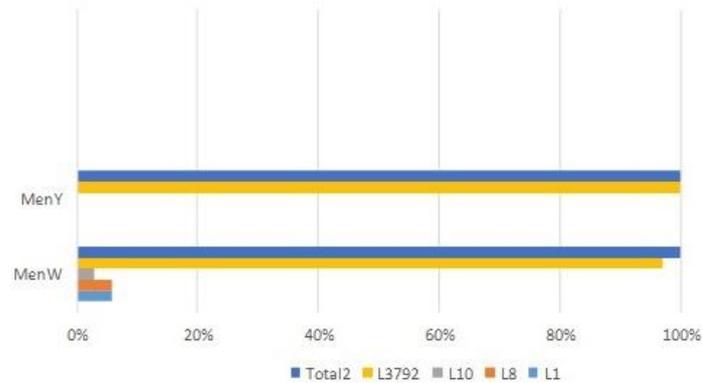
Figura 11 - Expressão de pili entre as cepas, por sorogrupo



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Dentre os imunotipos, o AcMo para L3,7,9 reconheceu 56 das 57 cepas (98,25%), enquanto os anticorpos para L1, L8 e L10, reconheceram, respectivamente, apenas 2 (3,51%), 2 (3,51%) e 1 (1,75%) cepas, como mostra a figura 12. Uma vez que todos os anticorpos monoclonais reconheceram ao menos uma das cepas, fica evidente que a reação ocorreu bem e que não existem problemas relacionados aos anticorpos.

Figura 12 - Expressão de imunotipo entre as cepas, por sorogrupo



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

A literatura sugere que a expressão ideal de pili é necessária para interação com as células do hospedeiro e que a remoção deste diminui o nível de adesão entre bactéria e célula (IMHAUS e DUMÉNIL, 2014; STEPHENS e McGEE, 1981); que mudanças na expressão do pili afetariam a patogênese da bactéria (KARUPPIAH e DERRICK, 2014). Os níveis séricos de LOS já foram relacionados à severidade da DMI (BRANDTZAEG, OVSTEBO e KIERULF, 1995), à indução de citocinas inflamatórias (WESTENDORP et al., 1997) e à sobrevivência da bactéria no soro (PLANT et al., 2006). Ambas as estruturas podem sofrer variação antigênica (KAHLER e STEPHENS, 1998; XU e SEIFERT, 2018). A sorotipagem de *N. meningitidis* está bem definida e abrange antígenos importantes (FRASCH, ZOLLINGER e POOLMAN, 1985). Contudo, tanto pili como LPS atuam na adesão da bactéria, processo essencial para o estabelecimento da DMI (BRAUN et al., 2002) e, conforme demonstrado por Urwin (2014), alguns antígenos são mantidos em clones hipervirulentos, logo, é interessante que as ações de vigilância caracterizem diferentes epítomos, o que pode aprofundar o conhecimento sobre as cepas circulantes. A capacidade de troca de cápsula de MenW e MenY contribuem para a virulência dos sorogrupos, pois a cápsula é um dos determinantes para o estabelecimento da doença (TZENG, THOMAS e STEPHENS, 2016). O evento ocorre pela conversão de genes responsáveis pela síntese da cápsula por transformação ou troca de alelos e é facilitado pela presença de MC em portadores sadios (SWARTLEY et al., 1997). Cabe destacar a importância do pili tipo IV para a transferência de genes e sua expressão nas cepas estudadas (82,45%), o que indica um potencial de troca de cápsula entre essas as cepas.

A emergência do sorogrupo W foi vista em regiões da América Latina, especialmente em países próximos do Brasil, como Argentina, Chile e Uruguai, já o sorogrupo Y teve um aumento de casos na região dos Andes (IBARZ-PAVÓN et al., 2012). A caracterização molecular de cepas brasileiras do sorogrupo W de 1995 a 2000 revelou que a maioria das cepas pertence ao complexo ST-11/ET37, que já havia sido descrito em outros países, como Suécia e Portugal (LEMOS et al., 2010). Em revisão de 2013, Abio, Neal e Beck já destacavam o aumento da incidência de MenW em diferentes países, inclusive em regiões da América Latina e, mais recentemente, Vuocolo et al. (2018) também apontaram o crescente número de casos de DMI que se devem a esse sorogrupo. A cepa hipervirulenta W:2a:P1.5,2 citada nos trabalhos de Lemos (2010) e Weidlich (2008) foi a principal responsável por casos de DMI no Chile, após uma rápida expansão que teve início em 2010, levando a uma campanha de vacinação com a vacina MenACWY em crianças com idade entre 9 meses e 5 anos, seguida pela implementação da mesma vacina no calendário nacional para crianças de até 1 ano (SÁFADI, BEREZIN e ARLANT, 2014; BORROW et al., 2017). Também em 2010, essa cepa foi a mais prevalente entre casos de doença meningocócica na Argentina (SORHOUEY-PEREIRA et al., 2013). Esses dados demonstram a alta capacidade de expansão de MenW e reforçam a importância da vigilância sobre cepas emergentes.

Estudos em países europeus tem demonstrado o aumento do sorogrupo Y. Além de Finlândia e Noruega comunicarem aumento dos casos de MenY, a Suécia registrou, em 2012, uma proporção de 49% de MenY entre os casos de DMI (SÄLL et al., 2017). A revisão de Peterson (2018) revela que estado de portadores de MenY é alto na Europa e baixo, porém constante, nos Estados Unidos. Oldfield et al. (2016) reportaram similaridades entre isolados de portadores e de pacientes com doença invasiva na Europa e enfatizam a importância dos portadores na epidemiologia da DMI, de modo que o aumento do número de portadores é acompanhado por aumento do número de casos. Além disso, a literatura também sugere que os surtos possam ocorrer após clones mais virulentos se espalharem entre portadores (STOLLENWERK, MAIDEN e JANSEN, 2004). Ainda que no Brasil não se tenha dados que apontem para uma elevação substancial da incidência de MenY, países próximos já reportaram elevação em sua incidência, o que convida a se manter a vigilância sobre o grupo e os dados encontrados sobre portadores

mostram a importância desse tipo de pesquisa, que enriquece o sistema de vigilância, reconhecendo tanto cepas que possam provocar surtos como a população responsável pela transmissão da bactéria.

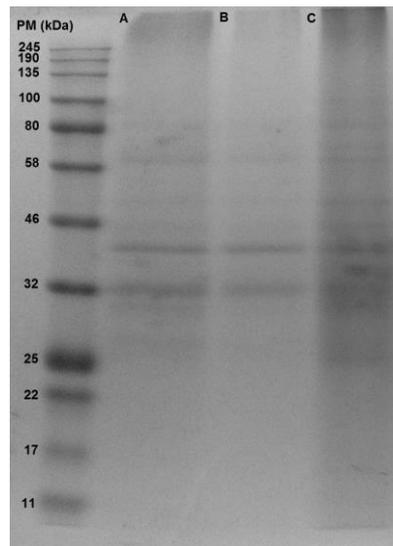
A imunização frente os sorogrupos W e Y se dá pelas vacinas conjugadas quadrivalentes ACWY, das quais três são licenciadas no Brasil: MenACWY-DT (Menactra®, Sanofi-Pasteur), MenACWY-CRM (Menveo®, GlaxoSmithkline Vaccine) e MenACWY-TT (Nimentrix®, Pfizer) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES, 2018). No Brasil, a rede pública de saúde oferece apenas a vacina conjugada contra MenC, enquanto as quadrivalentes estão disponíveis apenas na rede privada, salvo situações especiais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Em 2005, nos Estados Unidos, foi implementada a vacinação quadrivalente para adolescentes de 11 a 12 anos, principal grupo de risco, o que diminuiu a incidência de DMI causada por MenC, MenW e MenY (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). Um estudo holandês realizado após aumento da incidência de MenW demonstrou que adolescentes de 12 anos obtiveram boa resposta e memória imunológica à vacina quadrivalente conjugada (VAN RAVENHORST et al., 2017). Na Inglaterra, um estudo demonstrou que a vacina quadrivalente foi eficiente para proteger indivíduos vacinados, induzindo formação de anticorpos, bem como para diminuir o estado de portador em jovens de 18 a 24 anos, o que previne a transmissão e promove proteção de rebanho (READ, 2014). Não foram encontrados na literatura estudos de resposta de população brasileira à vacina quadrivalente.

Para Vuocolo et al. (2018), as campanhas de vacinação devem maximizar o potencial da imunoprevenção, identificando o grupo mais afetado e o grupo portador, que transmite o patógeno. Vista a elevação de MenW e MenY no Brasil e/ou em países próximos, seria interessante que se mantivessem as ações de vigilância sobre tais sorogrupos, além de se conduzir estudos para melhor entender o potencial patogênico das cepas e os grupos portadores, a fim de prever surtos e avaliar a implementação do PNI com vacinas meningocócicas tetravalentes.

6.2. SDS-PAGE e *Immunoblotting*

A figura 13 mostra o perfil antigênico das OMVs e células íntegras da cepa B4:P1,15. Os principais antígenos observados estão nas faixas de 58 kDa, 46 kDa, 32 kDa e 25 kDa. Com base na literatura, sugere-se que estes sejam, respectivamente: Tbp2, PorA, Opa e Opc (POLLARD e FRASCH, 2001).

Figura 13 - Perfil eletroforético da cepa B4:P1,15

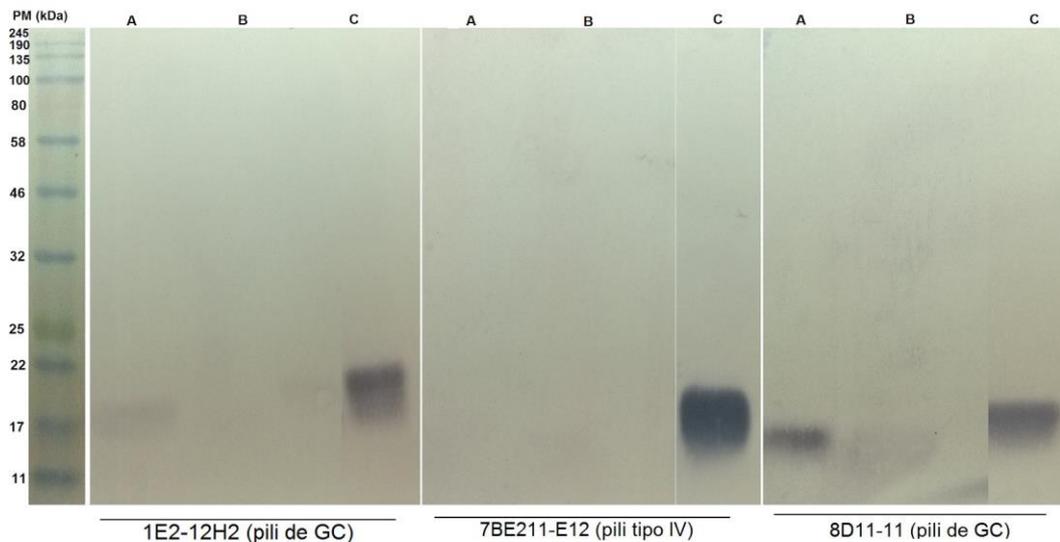


(A) OMVs, (B) células íntegras crescidas em ágar Müller-Hinton e (C) células íntegras crescidas em meio Catlin da cepa B4:P1,15. À esquerda, padrão de peso molecular. Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

O perfil antigênico das amostras mostra diversas estruturas que também atuam na adesão do patógeno, como Opa e Opc, as adesinas mais abundantes na membrana externa (HUNG e CHRISTODOULIDES, 2013). É importante ressaltar que o processo de adesão depende de diversas moléculas e o estabelecimento da doença se deve a todo o conjunto dos fatores de virulência do microrganismo.

A figura 14 mostra o padrão de peso molecular e a reação de *Immunoblotting*, com reconhecimento de bandas únicas na faixa de 17 kDa (HÉLAINE et al., 2005), o que demonstra a especificidade dos AcMo utilizados.

Figura 14 - Immunoblotting da cepa B4:P1,15 e anticorpos contra pili



À esquerda, padrão de peso molecular. A seguir, *Immunoblotting* de (A) OMVs, (B) células íntegras crescidas em ágar Müeller-Hinton e (C) células íntegras crescidas em meio Catlin. Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Como observado, o meio de cultura utilizado pode diminuir ou aumentar a expressão de antígenos. Enquanto as cepas cultivadas em ágar Müeller-Hinton não foram reconhecidas por nenhum AcMo, as cepas cultivadas em meio Catlin foram reconhecidas pelos três anticorpos testados, tendo maior expressão de pili tipo IV. O meio Catlin é utilizado em biorreatores para cultivo de cepas de MC com fins vacinais (SANTOS et al., 2006), logo, é interessante observar a influência na expressão antigênica. Supõe-se que resultados similares seriam obtidos se outras cepas fossem utilizadas no teste.

Anticorpos e derivados de anticorpos constituem 20% dos produtos biofarmacêuticos hoje, em desenvolvimento. Apesar dos problemas iniciais na utilização de anticorpos murinos, avanços na biologia molecular associados à tecnologia de hibridomas possibilitaram resultados promissores nas pesquisas envolvendo esses produtos. Atualmente, são utilizados na terapia de muitas doenças como uma alternativa viável (ROQUE, LOWE e TAIPA, 2004). Recentemente, o nosso laboratório preparou e utilizou dois novos AcMo como marcadores diferenciais de meningites bacterianas e virais por meio da técnica de imuno-histoquímica (LATARO et al., 2016). Como sabemos, os anticorpos monoclonais são considerados importantes ferramentas, com diferentes aplicabilidades.

7. CONCLUSÕES

As cepas de meningococo estudadas compartilharam epítomos de pili com cepas de GC, expressaram pili tipo IV e expressaram imunotipo L3,7,9, o que sugere que as cepas dos sorogrupos W e Y circulantes no país possuem elevado potencial patogênico;

Os anticorpos utilizados foram específicos no ensaio de *Immunoblotting*;

O uso de diferentes meios de cultivo influenciou a expressão de antígenos pelas bactérias;

Em decorrência da crescente incidência dos sorogrupos estudados, principalmente MenW, é importante que seja realizada a caracterização dos antígenos das cepas circulantes, bem como reforçar a vigilância sobre a DMI com estudos de portadores, para melhor traçar medidas de controle, independente do sorogrupo em questão.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Elsevier:Rio de Janeiro, 2015.
- ABDILLAHI, H.; POOLMAN, J.T. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 48, n. 3, p. 367-371, 1987.
- ABIO, A.; NEAL, K.R.; BECK, C.R. An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years. **Pathog Glob Health.**, v. 107, n. 7, p. 373-380, 2013.
- AHO, E.L. et al. Characterization of a Class II Pilin expression locus from *Neisseria meningitidis*: evidence for increased diversity among pilin genes in pathogenic *Neisseria* species. **Infect Immun.**, v. 65, n.7, p. 2613-2620, 1997.
- AGUDELO, C.I.; SANABRIA, O.M.; OVALLE, M.V. Serogroup Y meningococcal disease, Colombia. **Emerg Infect Dis.**, v. 14, n. 9, p. 990-991, 2008.
- AGUILERA, J.F. et al. Outbreak of Serogroup W135 Meningococcal Disease after the Hajj Pilgrimage, Europe, 2000. **Emerg Infect Dis.**, v. 8, n. 8, p. 761-767, 2002.
- BARRETO, M.L. et al. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **Lancet.**, p. 47-60, 2011.
- BARROSO, D.E.; REBELO, M.C. Recognition of the epidemiological significance of *Neisseria meningitidis* capsular serogroup W135 in the Rio de Janeiro region, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 102, n. 6, p. 773-775, 2007.
- BOOY, R. et al. Recent changes in the epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup W across the world, current vaccination policy choices and possible future strategies. **Hum Vaccin Immunother.**, p. 1-11, 2018.
- BORROW, R. et al. Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes. **Vaccine**, v. 31, n. 41, p. 4477-4486, 2013.
- BORROW, R. et al. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. **Expert Rev Vaccines.**, v. 16, n.4, p. 313-328, 2017.
- BRANCO, R.G.; AMORETTI, C.F.; TASKER, R.C. Doença meningocócica e meningite. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 2, p. 46-53, 2007.
- BRANDTZAEG, P.; OVSTEBØ, R.; KIERULF, P. Bacteremia and compartmentalization of LPS in meningococcal disease. **Prog Clin Biol Res.**, v. 392, p.219-233,1995.
- BRASIL. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Instituto Adolfo Lutz. **Informação da vigilância das pneumonias e meningites bacterianas**. 2017.
- BRAUN, J.M. et al. Proinflammatory responses to lipo-oligosaccharide of *Neisseria meningitidis* immunotype strains in relation to virulence and disease. **J. Infec Dis.**, v. 185, n. 10, p. 1431-1438, 2002.

- BRÖKER, M. et al. Meningococcal serogroup Y emergence in Europe. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 8, n. 12, p. 1907-1911, 2012.
- BYRNE, B. et al. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. **Sensors**, v. 9, n. 6, p. 4407-4445, 2009.
- Cannon, J.G. et al. Monoclonal antibody that recognizes an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to most nonpathogenic *Neisseria* species. **Infect Immun.**, v. 43, n. 3, p.994-999, 1984.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revised recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices to vaccinate all persons aged 11–18 years with meningococcal conjugate vaccine. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 56, n. 31, p. 794-795, 2007.
- COORDENAÇÃO GERAL DO PROGRAMA DE IMUNIZAÇÕES; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE PARA AS AMÉRICAS. Vacinas contra meningococo: vacinas polissacarídicas e vacinas conjugadas polissacarídicas. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 77, n. 40, p.329-340, 2002.
- COUREUIL, M. et al. Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. **Science**, v. 325, n. 5936, p. 83-87, 2009.
- DIÁS, J.L.; VIRJI, M.; HECKLES, J.E. Structural and antigenic differences between two types of meningococcal pili. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 21, n. 2, p. 181-184, 1984.
- ERIKSSON, J. et al. Characterization of motility and piliation in pathogenic *Neisseria*. **BMC Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 92, 2015.
- FEAVERS, I.M.; PIZZA, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. **Vaccine**, v. 27, p. 42-50, 2009.
- FONSECA et al. Diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas. **R Ci Med Biol.**, v.10, n. 1, p. 77-81, 2011.
- FRASCH, C.E.; ZOLLINGER, W.D.; POOLMAN, J.T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Rev Infect Dis.**, v.7, n. 4, p. 504-510, 1985.
- GERSHONI, J.M.; PALADE, G.E. Protein blotting: principles and applications, **Anal Biochem.**, v. 131, n.1, p. 1-15, 1983.
- GIULIANI, M. M. et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **PNAS**, v. 103, n. 29, p. 10834-10839, 2006.
- GODING, J.W. **Anticorpos monoclonais: princípios e prática**. 3 ed. Elsevier:São Paulo, 1996.
- GROGAN, J.; ROOS, K. Serogroup B meningococcus outbreaks, prevalence, and the case for standart vaccination. **Curr Infect Dis Rep.**, v. 19, n. 30, 2017.
- HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A dot-Immuno-binding assay for monoclonal and other antibodies. **Anal Biochem.**, v. 119, n. 1, p. 142-147, 1982.
- HECKLES, J.E. Structure and function of Pili of pathogenic *Neisseria* species. **Clin Microbiol Rev.**, v. 2, p. S66-S73, 1989.

- HEDBERG, S.T. et al. Genetic characterization of the emerging invasive *Neisseria meningitidis* serogroup Y in Sweden, 2000 to 2010. **Euro Surveill.**, v. 16, n. 23, p. 19885, 2011.
- HÉLAINE, S. et al. PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. **Mol Microbiol.**, v. 55, n. 1, p. 65-77, 2005.
- HÉLAINE, S. et al. 3D structure/function analysis of type PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. **PNAS.**, v. 104, n. 40, p. 15888-15893, 2007.
- HUNG, M.C. e CHRISTODOULIDES, M. The Biology of Neisseria Adhesins. **Biology**, v. 2, n. 3, p. 1054-1109, 2013.
- IBARZ-PAVÓN, A.B. et al. Laboratory-based surveillance of *Neisseria meningitidis* isolates from disease cases in Latin American and Caribbean Countries, SIREVA II 2006–2010. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44102, 2012.
- IMHAUS, A.F.; DUMÉNIL, G. The number of *Neisseria meningitidis* type IV pili determines host cell interaction. **EMBO J.**, v. 33, n. 16, p. 1767-1783, 2014.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. **BEPA**, v. 4, n. 40, p. 24-27, 2007.
- JAFRI, R.Z. et al. Global epidemiology of invasive meningococcal disease. **Popul Health Metr.**, v. 11, n. 17, 2013.
- JOHNSTON, K.H.; HOLMES, K.K.; GOTSCHLICH, E.C. The serological classification of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Exp Med.**, v. 143, n. 4, p. 741-758, 1976.
- JONES, D.M. et al. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. **Microb Pathog.**, v. 13, n.3, p. 219-224, 1992.
- KAHLER, C.M.; STEPHENS, D.S. Genetic basis for biosynthesis, structure and function of Meningococcal Lipooligosaccharide (Endotoxin). **Crit Rev Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 281-334, 1998.
- KARUPPIAH, V.; DERRICK, J.P. Type IV pili – a numbers game. **EMBO J.**, v. 33, n. 16, p. 1732-1734, 2014.
- KOLAPPAN, S. et al. Structure of the *Neisseria meningitidis* Type IV pilus. **Nat Commun.** v. 4, n. 7, p. 13015, 2016.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LAGUARDIA, J. et al. Sistema de informação de agravos de notificação em saúde (Sinan): desafios no desenvolvimento de um sistema de informação em saúde. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 13, n. 3, p. 135-146, 2004.
- LATARO, T.R.B. et al. Avaliação de anticorpos monoclonais como marcadores diferenciais de meningites bacterianas e virais por meio de técnica de imunohistoquímica. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, v. 75, p. 1-7, 2016.

LEMOS, A.P.; ELIAS JUNIOR, W.P.; CAMPOS, L.C. *Neisserias*. 2015. IN: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015. cap. 27.

LEMOS, A.P.S. et al. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. **J Infect.**, v. 60, n. 3, p. 209-217, 2010.

LEWIS L.A.; CARTER, M.; RAM, S. The relative roles of Factor H Binding Protein, Neisseria Surface Protein A, and Lipooligosaccharide sialylation in regulation of the alternative pathway of complement on Meningococci. **J Immunol.**, v. 188, p. 5063-5072, 2012.

LUCIDARME, J. et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. **J Infect.**, v. 71, n. 5, p. 544-552, 2015.

MANDRELL, R.E.; ZOLLINGER, W.D. Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition. **Infect Immun.**, v. 16, n. 2, p. 471-475, 1977.

MASSARI, P. et al. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. **Trends in Microbiol.**, v. 11, n. 2, p. 87-93, 2003.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediadas por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol.**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MILLER, F. et al. The hypervariable region of Meningococcal major pilin PilE controls the host cell response via antigenic variation. **mBio**, v. 5, n. 1, e-01024-013, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 2ª ed. Brasília, 2017.

MORAES, J.C.; BARATA, R.B. A doença meningocócica em São Paulo, Brasil, no século XX: características epidemiológicas. **Cad Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1458-1471, 2005.

MORAND, P.C. et al. *Neisseria meningitidis* differentially controls host cell motility through PilC1 and PilC2 components of Type IV Pili. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6834, 2009.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Elsevier:Rio de Janeiro, 2009.

NASSIF, X. et al. Antigenic variation of pillin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. **Mol Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 719-725, 1993.

NI, D.; Xu, P.; GALLAGHER, S. Immunoblotting and Immunodetection. **Curr Protoc Mol Biol.**, v. 83, n. 1, p. 10.8.1.-10.8.28, 2016.

OLDFIELD, N.J. et al. Genomic analysis of serogroup Y *Neisseria meningitidis* isolates reveals extensive similarities between carriage-associated and disease-associated organisms. **J Infect Dis.**, v. 213, n. 11, p. 1777-1785, 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. **Surveillance of bacterial pneumonia and meningitis in children aged under 5 years field guide**. Washington, 2010.

PETERSON, M.E. et al. Meningococcal carriage in high-risk settings: a systematic review. **Int J Infect Dis.**, v. 73, p. 109-117, 2018.

PLANT, L. et al. Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1360-1367, 2006.

POLLARD, A.J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 19, n. 11, p. 1327-1346, 2001.

POOLMAN, J.T.; HOPMAN, C.T.P.; ZANEN, H.C. Colony variants of *Neisseria meningitidis* strain 2996 (B:2b:P1.2): Influence of class-5 Outer membrane proteins and lipopolysaccharides. **J Med Microbiol.**, v. 19, n. 2, p. 203-209, 1985.

RAM, S. et al. The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. **Mol Immunol.**, v. 36, n. 13-14, p. 915-928, 1999.

van RAVENHORST, M.B. et al. Adolescent meningococcal serogroup A, W and Y immune responses following immunization with quadrivalent meningococcal A, C, W and Y conjugate vaccine: Optimal age for vaccination. **Vaccine**, v. 35, n. 36, p. 4753-4760, 2017.

READ R.C. et al. Effect of a quadrivalent meningococcal ACWY glycoconjugate or a serogroup B meningococcal vaccine on meningococcal carriage: an observer-blind, phase 3 randomised clinical trial. **Lancet.**, v. 384, n. 9960, p. 2123-2131, 2014.

RIBATTI, D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. **Immunol Lett.**, v. 161, n. 1, p. 93-99, 2014.

ROSENSTEIN, N.E. et al. The Changing Epidemiology of Meningococcal Disease in the United States, 1992–1996. **J. Infect Dis.**, v. 180, n. 6, p. 1894-1901, 1999.

ROQUE, A.C.A., LOWE, C.R., TAIPA, M.A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. **Biotechnol Prog.**, v. 20, n. 3, p. 639-654, 2004.

ROUPHAEL, N.G. e STEPHENS, D.S. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology and epidemiology. **Methods Mol Biol.**, v. 799, p. 1-20, 2012.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. Superintendência de Vigilância em Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Meningites em Geral e Doença Meningocócica**. Florianópolis, 2014.

SÁFADI, M.A.P.; BARROS, A.P. Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. **J Pediatr (Rio de J)**, v. 82, n. 3, p. 35-44, 2006.

SÁFADI, M.A.P. et al. The current situation of meningococcal disease in Latin America and recommendations for a new case definition from the Global Meningococcal Initiative. **Expert Rev Vaccines.**, v. 12, n. 8, p. 903-915, 2014.

SADARANGANI, M.; POLLARD, A.J. Serogroup B meningococcal vaccines: an unfinished history. **Lancet Infect Dis.**, v. 10, n. 2, p. 112-124, 2010.

- SÄLL, O. et al. Clinical presentation of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup Y in Sweden, 1995 to 2012. **Epidemiol Infect.**, v. 145, n. 10, p. 2137-2143, 2017.
- SANTOS, S. et al. Production of outer membrane vesicles (OMV) in batch cultivation of *Neisseria meningitidis* serogroup B. **Braz J Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 6064-6069, 2006.
- SCARSELLI, M. et al. Epitope mapping of a bactericidal monoclonal antibody against the Factor H Binding Protein of *Neisseria meningitidis*. **J Mol Biol.**, v. 386, n. 1, p. 97-108, 2009.
- SEIFERT, H.S. et al. Shuttle mutagenesis of *Neisseria gonorrhoeae*: pilin null mutations lower DNA transformation competence. **J Bacteriol.**, v. 172, n. 1, p. 40-46, 1990.
- SHAKER, R.; FAYAD, D.; DBAIBO, G. Challenges and oportunities for Meningococcal vaccination in the developing world. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 14, n. 5, p. 1084-1097, 2018.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO; DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO RESPIRATÓRIA; CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA; CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE-SP. Meningites: dados estatísticos, 2019. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/meningites/dados/meningites.pdf>>. Acesso em 15 jan. 2019.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Sociedade Brasileira de Imunizações. Departamento Científico de Imunizações. **Vacinas meningocócicas conjugadas no Brasil em 2018: Intercambialidade e diferentes esquemas de doses.** Nota técnica. 2018. Disponível em: <[http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/NOTA_TECNICA_CONJUNTA_SBIM_SBP - meningo vacinas final-jul18_002 .pdf](http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/NOTA_TECNICA_CONJUNTA_SBIM_SBP_-_meningo_vacinas_final-jul18_002_.pdf)>. Acesso em 10 dez. 2018.
- SORHOUEP-PEREIRA, C. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Neisseria meningitidis* disease-causing strains in Argentina, 2010. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58065, 2013.
- SPRONG, T. et al. Contributions of *Neisseria meningitidis* LPS and non-LPS to proinflammatory cytokine response. **J Leukoc Biol.**, v. 70, n. 2, p. 283-288, 2001.
- STEPHENS, D.S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 27, n. 2, p. 71-77, 2009.
- STEPHENS, D.S. et al. Common epitopes of pilin of *Neisseria meningitidis*. **J Infect Dis.**, v. 158, n. 2, p. 332-342, 1988.
- STEPHENS, D.S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. **Lancet.**, v. 369, n. 9580, p. 2196-2210, 2007.
- STEPHENS, D.S.; MCGEE, Z.A. Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. **J Infect Dis.**, v. 143, n. 4, p. 525-532, 1981.

- STOLLENWERK, N.; MAIDEN M.C.J.; JANSEN V.A.A. Diversity in pathogenicity can cause outbreaks of meningococcal disease. **PNAS.**, v. 101, n. 27, p. 10229-10234, 2004.
- STOTT, D.I. Immunoblotting and Dot-blotting. **J Immunol Methods.**, v. 119, n. 2, p. 153-187, 1989.
- SULTAN, I. et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. **Front Microbiol.**, v. 9, 2018.
- SWARTLEY, J.S. et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **PNAS**, v. 94, n. 1, p.271-276, 1997.
- TEIXEIRA, M.G. et al. Seleção das doenças de notificação compulsória: critérios e recomendações para as três esferas de governo. **Inf Epidemiol SUS.**, v. 7, n. 1, p. 7-28, 1998.
- THANASSI, D.G.; BLISKA, J.B.; CHRISTIE, P.J. Surface organelles assembled by secretion system of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. **FEMS Microbiol.**, v. 36, n. 6, p. 1046-1082, 2012.
- TSANG, R.S.W. et al. Genetic and antigenic analysis of invasive serogroup Y *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1999 to 2003 in Canada. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1753-1758, 2007.
- TZENG, Y.L.; STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microb Infect.**, v. 2, n. 6, p. 687-700, 2000.
- TZENG, Y.L.; THOMAS, J.; STEPHENS, D.S. Regulation of capsule in *Neisseria meningitidis*. **Crit Rev Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 759-772, 2016.
- URWIN, R. et al. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. **Infect Immun.**, v. 72, n. 10, p. 5955-5962, 2004.
- VIRJI, M. et al. The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. **Mol Microbiol.**, v. 5, n. 8, p. 1831-1841, 1991.
- VIRJI, M.; HECKLES, J.E. Antigenic cross-reactivity of *Neisseria* Pili: Investigations with type and species-specific Monoclonal Antibodies. **J Gen Microbiol.**, v. 129, n. 9, p. 2761-2768, 1983.
- VUOCOLO, S. et al. Vaccination strategies for the prevention of meningococcal disease. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 14, n. 5, p. 1203-1205, 2018.
- WEDEGE, E. et al. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. **J Med Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 195-201, 1990.
- WEIDLICH, L. et al. High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. **J Infect.**, v. 57, p. 324-331, 2008.
- WESTENDORP, R.G. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet.**, v. 349, n. 9046, p. 170-173, 1997.

WEYAND, N.J. et al. *Neisseria* infection of rhesus macaques as a model to study colonization, transmission, persistence, and horizontal gene transfer. **PNAS.**, v. 110, n. 8, p. 3059-3064, 2013.

WILHELM, J.B.; VILLENA, M.R. Historia y epidemiología del meningococo. **Rev Chil Pediatr.**, v. 83, n. 6, 2012.

XU, J.; SEIFERT, H.S. Analysis of pilin antigenic variation in *Neisseria meningitidis* by next-generation sequencing. **J Bacteriol.**, v. 200, n. 22, p. e00465-18, 2018.

6-MBL-LIFESCIENCE-IMMUNOBLOTTING DETECTION.PNG. Altura: 210 pixels. Largura: 715 pixels. True Color 32 bits. 41,9 KB. Formato PNG. In: MBL Lifescience. **The principle and method of Western blotting (WB)**. Disponível em: < <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/westernblotting.html>>. Acesso em 07 nov. 2018.