

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Flávia de Paiva Silva**

Utilização da tecnologia multiparamétrica por citometria de fluxo para detecção dos níveis de Imunoglobulina G total induzida pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W

Rio de Janeiro

2019

**FLÁVIA DE PAIVA SILVA**

Utilização da tecnologia multiparamétrica por citometria de fluxo para detecção dos níveis de Imunoglobulina G total induzida pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Formação em Pesquisa Biomédica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito a obtenção ao título de Mestre em Pesquisa Biomédica

**ORIENTADORA:** ANA PAULA DOS SANTOS

RIO DE JANEIRO 2019

Silva, Flávia de Paiva

Utilização da tecnologia multiparamétrica por citometria de fluxo para detecção dos níveis de Imunoglobulina G total induzida pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W. / Flávia de Paiva Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019.

89 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Ana Paula dos Santos

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado em Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

Referências: f. 78-89.

1. Vacinas Meningocócicas. 2. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 3. Citometria de fluxo. 4. Imunoglobulina G. 5. *Neisseria meningitidis*. 6. Vacinas combinadas. 7. Pesquisa Biomédica - tese. I. Santos, Ana Paula dos. II. UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado em Formação para a Pesquisa Biomédica. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, toda a honra e glória, sem Ele nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS em primeiro lugar pela força, sustento e sabedoria nas horas em que as dúvidas e as incertezas pairavam.

Aos meus pais (Rita e Lúcio) pela base sólida de valores morais, respeito e amor.

Aos meus filhos (Isabel Cristina, Emanuel Antônio e Hanna Elise) que sempre ao meu lado acreditam em mim com imensurável amor.

Ao meu esposo que me ensinou o poder da resiliência e acreditar que das cinzas Deus faz tudo novo.

A minha maravilhosa orientadora Dra. Ana Paula dos Santos pelo aprendizado, paciência, organização e oportunidade de participar de sua equipe.

A VPROD e VDETC pela oportunidade e entendimento que a interface entre a produção e o desenvolvimento promovem o crescimento do recurso humano que compõe Bio-Manguinhos.

A minha gerente do DEBAC Maria do Carmo e meu gerente da DIACP Felipe Rodrigues pela oportunidade.

A minha equipe Rafael Ficha e William da Conceição Rodrigues.

Ao LATEB, Dra. Ivna Alana da Silveira, Dr. Milton Neto da Silva, Dra. Marilza Batista e Dra. Maria de Lourdes de Moura Leal.

Ao Dr. Álvaro Bertho, Dra Marta Santiago e Thaíssa do IOC.

A equipe do Laboratório imunoenzimático, Denise Pereira, Fernanda Otaviano Martins e Ana Cristina Melo (vocês são 1000!).

A Úrsula Fernanda que foi e é totalmente usada por Deus, muito choro, muita luta mas muita vitória.

As orações e cobertura espiritual da minha pastora Maria Conceição e irmãs ADAV.

Aos professores e coordenadores do Mestrado Profissional Tecnológico do IBCCF.

Porque sou eu que conheço os planos que tenho de  
vocês, diz o Senhor,” planos de fazê-los prosperar e não de causar  
dano, planos de  
dar a vocês esperança e um futuro”.

**(Jeremias 29:11)**

## RESUMO

Silva, Flávia de Paiva. Utilização da tecnologia multiparamétrica por Citometria de fluxo para detecção dos níveis de Imunoglobulina G total induzida pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O desenvolvimento de novas vacinas meningocócicas contra *Neisseria meningitidis*, em cada país, depende das cepas circulantes, custo e disponibilidade. O ELISA tem sido muito utilizado na avaliação da potência e estabilidade em estudos pré-clínicos e clínicos destas vacinas. Porém o ELISA é laborioso, sua avaliação é monoparamétrica e apresenta alto percentual de coeficiente de variação (CV). Mediante a estes fatores, o presente trabalho propõe uma avaliação multiparamétrica, por citometria de fluxo para a detecção de títulos de IgG total induzidos pelos polissacarídeos dos grupos A, C e W de *Neisseria meningitidis*, em soros de camundongos suíços imunizados com a vacina tetravalente ACWY conjugada comercial, onde foi analisado o tempo de execução do teste, a sensibilidade, e a capacidade de processamento de várias amostras, sendo fatores adequados para tornar-se um teste alternativo ao ELISA. Enquanto, o ELISA foi capaz de detectar os títulos de IgG total induzidos pelos polissacarídeos somente a partir da segunda dose da vacina, a citometria de fluxo detectou títulos após a primeira dose, com diferença estatística significativa quando foram comparados a amostra pré-imune (T0) ( $p < 0,0001$ ). A análise monoparamétrica e a multiparamétrica, por citometria de fluxo, foram altamente correlacionáveis na análise dos títulos de IgG induzidos pelos três antígenos polissacarídicos, sugerindo que não ocorreu uma interferência entre os antígenos adsorvidos as microesferas utilizadas na detecção dos anticorpos. A metodologia de referência (ELISA) apresentou uma alta correlação com a metodologia proposta (citometria de fluxo) (PSA  $r = 0,9885$ ; PSC  $r = 0,9912$ ; PSW  $r = 0,9775$ ) para os três polissacarídeos, porém com uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) devido ao período inicial de detecção dos títulos de anticorpos, sugerindo uma maior sensibilidade da citometria de fluxo e com isso, mostrando-se um teste com probabilidade de ser utilizado como alternativa ao ELISA nos estudos pré-clínicos e clínicos das

vacinas conjugadas e combinadas .

Palavras chaves: Vacinas combinadas, ELISA e Citometria de Fluxo.

## ABSTRACT

Silva, Flávia de Paiva. Use of the multiparametric technology by flow cytometry to detect the levels of total Immunoglobulin G induced by *Neisseria meningitidis* polysaccharides groups A, C and W. Rio de Janeiro, 2019. Dissertation (Professional Master of Training for Biomedical Research) - Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics - Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The development of new meningococcal vaccines against *Neisseria meningitidis* in each country depends on the circulating strains, cost and availability. ELISA has been widely used in the evaluation of potency and stability in preclinical and clinical studies of these vaccines. However the ELISA is laborious, its evaluation is monoparametric and presents high coefficient of variation. By means of these factors, the present work proposes a multiparametric evaluation, by flow cytometry for the detection of total IgG titers induced by the polysaccharides of groups A, C and W of *Neisseria meningitidis*, in sera from Swiss mice immunized with the tetravalent ACWY vaccine conjugate, where it was evaluated the test run time, the sensitivity, and the processing capacity of several samples, being positive factors to become an alternative test to the ELISA. While the ELISA was able to detect the total IgG titers induced by the polysaccharides only from the second dose of the vaccine, flow cytometry detected titers after the first dose, with a statistically significant difference when comparing the preimmune sample (T0) ( $p < 0.0001$ ). The monoparametric and multiparametric analysis, by flow cytometry, were highly correlated in the analysis of the IgG titers induced by the three polysaccharide antigens, suggesting that there was no interference between the antigens adsorbed and the microspheres used in the detection of the antibodies. The reference methodology (ELISA) showed a high correlation with the proposed methodology (flow cytometry) (PSA  $r = 0.9885$ ; PSC  $r = 0.9912$ ; PSW  $r = 0.9775$ ) for the three polysaccharides, but with a statistically significant difference ( $p < 0.0001$ ) due to the initial period of detection of antibody titers, suggesting a greater sensitivity of flow cytometry and showing a test likely to be used as an alternative to ELISA in the preclinical and clinical studies of conjugate and combined vaccines.

Keywords: Combined vaccines, ELISA and Flow cytometry.

## LISTA DE SIGLAS

**ACIP** – do inglês ‘*Advisory Committee on Immunization Practices*’ (Comitê Consultivo em Práticas de Imunização)

**aHUS** – Síndrome urêmica hemolítica atípica

**BP** – do inglês ‘bend pass’

**CRM<sub>197</sub>** – Toxina Diftérica geneticamente detoxificada

**Cutoff** – ponto de corte

**dLOS** – Lipooligossacarídeo detoxificado

**DM** – Doença Meningocócica

**DMTMM** - 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinium chloride

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**EDC** – 1-ethyl- 3-[3dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride

**ELISA** – do inglês ‘*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*’ (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

**ELISPOT** - do inglês ‘enzyme-linked immune absorbent spot’

**FDA** – do inglês ‘*Food and Drug Administration*’

**fH** – regulador plasmático do complemento, proteína ligante do fator H

**fHbp** – proteína de fusão ligante do fator H

**FITC** – Isotiocianato de fluoresceína

**Hib** – *Haemophilus influenzae* do tipo b

**hSBA** – do inglês ‘*human Serum Bactericidal Antibody*’ (Avaliação dos anticorpos bactericidas humano)

**IFM** – Intensidade de Fluorescência Média

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IT** – Instrução de trabalho

**Ln** – logarítmo natural

**LOS** – Lipooligossacarídeo

**Menactra** – Vacina Tetravalente A, C, W e Y conjugada a anatoxina tetanica

**MenACWY** – Vacina norte americana quadrivalente

**MenAfriVac** – Vacina africana grupo A

**MenCPS-TT** – Vacina brasileira fabricada por BioManguinhos-Fiocruz

**MenHibrix** – Vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b e Meningocócicos C e Y

**Meningitec** – Vacina grupo C conjugada a variante atóxica da toxina diftérica CRM<sub>197</sub>

**Menintorix** – Vacinas contra *Haemophilus influenzae* tipo b e Menicgococo C

**Menjugate** – Vacina grupo C conjugada a variante atóxica da toxina diftérica CRM<sub>197</sub>

**Menveo - Neisvac** – Vacina grupo C conjugada ao Toxoide Tetânico

**Menveo** – Vacina Tetravalente A, C, W e Y conjugada ao CRM<sub>197</sub>

**MES** - Ácido 2-*N*- Morfolinoetanosulfônico

**MESF** – do inglês ‘molecules of equivalent soluble fluorochrome’

**mg/ml** – miligrama por mililitro

**mHSA** – do inglês ‘*Methylated Human Albumin*’ (Albumina metilada humana)

**MnB** – Vacina Meningocócica **B**

**NadA** – proteína de adesão

**NANA** – Ácido siálico

**NHBA** – proteína de fusão ligante de Heparina

**NspA** – Proteína de superfície *Neisseria A*

**PBS** – Solução tamponada de fosfato

**PLL** – Poli-L-lisina

**PMT** – Proteína Monomérica Tetânica

**PNI** – Programa Nacional de Imunização

**PorB** – porina B

**PS** - polissacarídeo

**PSA** – Polissacarídeo grupo A

**PSC** – Polissacarídeo grupo C

**PSW** – Polissacarídeo grupo W

**QFC** – do inglês ‘quantitativo flow cytometry’

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SBA** – do inglês ‘*Serum Bactericidal Antibody*’ (Avaliação dos anticorpos bactericidas)

**SD** – do inglês ‘*Standard Deviation*’ (Desvio Padrão)

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SINAN** – Sistema de Comunicação de Agravos de notificação

**SSC** - complexidade área de dispersão da luz

**Sulfo-NHS** – N-hidroxysulfosuccimide

**TBS** – Tampão fosfato + TRIS

**TT** – Toxóide Tetânico

**UA/ml** – Unidade arbitrária por mililitro

**VA-MENGOB-BC** – Vacina cubana contra *N. meningitidis* grupo B e C de Vesícula de Membrana Externa

**VME** – Vesícula de Membrana Externa

**WHO** – do inglês ‘World Health Organization’ (Organização Mundial de Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Meningite bacteriana no Brasil.....	22
Figura 2.	Esquema de membrana da <i>N.meningitidis</i> .....	26
Figura 3.	Estrutura do Polissacarídeo A.....	27
Figura 4.	Estrutura molecular dos Polissacarídeos C e W.....	28
Figura 5.	Polissacarídeo Meningococo W.....	28
Figura 6.	Distribuição global dos grupos de <i>N. meningitides</i> .....	30
Figura 7.	Diferentes formas de produzir vacinas conjugadas.....	37
Figura 8.	Esquema ELISA Indireto.....	40
Figura 9.	Esquema de citometria de fluxo – análise da amostra e aquisição de dados .....	43
Figura 10.	Esquema de análises utilizando microesferas carboxiladas marcadas com fluorocromo em intensidades diferentes para cada antígeno.....	45
Figura 11.	Coletas sanguíneas feitas em pools de 5 animais.....	47
Figura 12.	Esquema de coletas e imunizações.....	47
Figura 13.	Esquematização etapas ELISA.....	49
Figura 14.	Reação de Conjugação.....	50
Figura 15.	Citômetro de fluxo Cytotflex e histograma de intensidade de fluorescência FITC.....	52
Figura 16.	Quantificação dos títulos de IgG total, contra os polissacarídeos de <i>Neisseria meningitidis</i> A, C e W pelo ensaio ELISA.....	56
Figura 17.	Representação gráfica das microesferas carboxiladas com intensidades diferentes do fluorocromo Starfire Red.....	58
Figura 18.	Comparação das concentrações de PSC utilizado no acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na citometria de fluxo.....	59
Figura 19.	Histograma representativo dos títulos de IgG total do soro padrão murino para o polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo C e do controle negativo (microesferas + conjugado).....	62

Figura 20.	Comparação das concentrações de PSA utilizado no acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na citometria de fluxo.....	63
Figura 21.	Histograma representativo dos títulos de IgG total do soro padrão murino para o polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo A e do controle negativo.....	64
Figura 22.	Comparação das concentrações de PSW utilizado no acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na citometria de fluxo.....	65
Figura 23.	Histograma representativo dos títulos de IgG total do soro padrão murino para o polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo W e do controle negativo (microesferas + conjugado).....	66
Figura 24.	Representação do <i>Cutoff</i> para o ELISA e citometria de fluxo na pesquisa do título de IgG total contra o polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo A, C e W.....	70
Figura 25.	Quantificação dos títulos de IgG total para PSA (A), PSC (B) e PSW (C), a partir do soro de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo® por citometria de fluxo.....	72
Figura 26.	Quantificação dos títulos de IgG total para PSA (A), PSC (B) e PSW (C) concomitantemente, a partir do soro de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo® por citometria de fluxo .....	73
Figura 27.	Representa os títulos de IgG total contra os polissacarídeos A (A), C (B) e W (C) de <i>Neisseria meningitidis</i> , a partir de amostras sanguíneas de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo® por citometria de fluxo (ensaio mono e multiparamétrico).....	74
Figura 28.	Títulos de IgG total analisados por citometria de fluxo e ELISA, contra os polissacarídeos A (A) ( $p = 0,0001$ ), C (B) ( $p = 0,0189$ ) e W (C) ( $p = 0,0011$ ) de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	75
Figura 29.	Comparação do resultado de oito etapas da diluição seriada dos soros padrão contra os polissacarídeos de <i>Neisseria meningitidis</i> grupos A (A), W (B) e C (C) pelo ELISA e pela citometria de fluxo.....	76

## LISTA DAS TABELAS

Tabela 1.	Resumo cronológico da doença meningocócica.....	25
Tabela 2.	Estrutura química dos polissacarídeos encontrados nos grupos mais frequentemente relacionados com a doença meningocócica.....	27
Tabela 3.	Concentrações dos polissacarídeos A,C e W.....	59
Tabela 4.	Correlação das concentrações de PSC utilizadas na técnica de citometria de fluxo com o ELISA para PSC.....	59
Tabela 5.	Correlação das concentrações de PSA utilizadas na técnica de citometria de fluxo com o ELISA para o mesmo polissacarídeo.....	62
Tabela 6.	Correlação das concentrações de PSW utilizadas na técnica de citometria de fluxo com o ELISA para o mesmo polissacarídeo.....	65
Tabela 7.	Curva padrão do tempo de retenção dos reagentes e produtos da reação de conjugação mimetizada.....	68
Tabela 8.	Áreas relativas correspondentes ao tempo de retenção dos reagentes, produtos e subprodutos da reação de conjugação mimetizada (ácido Siálico).....	69
Tabela 9.	Áreas relativas correspondentes ao tempo de retenção dos reagentes, produtos e subprodutos da reação de conjugação mimetizada (Inositol).....	69

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	20
2.	Revisão Bibliográfica.....	23
2.1.	História da Doença Meningocócica.....	23
2.2.	Etiologia.....	25
2.3.	Epidemiologia.....	29
2.3.1	Distribuição geográfica e sazonal.....	29
2.4.	Vacinas Meningocócicas.....	31
2.4.1.	Resposta Imune aos Polissacarídeos.....	36
2.4.2.	Mecanismos da resposta imunológica aos meningococos e métodos utilizados na avaliação.....	38
3.	Justificativa.....	45
4.	Objetivo.....	45
4.1.	Objetivos específicos.....	46
5.	Materiais e Métodos.....	46
5.1.	Imunização dos camundongos.....	46
5.2.	Padronização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a pesquisa dos níveis de IgG total induzidos pelos polissacarídeos dos grupos A e W de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	48
5.3.	Padronização do teste de acoplamento de polissacarídeos nas microesferas fluorescentes.....	49
5.3.1.	Concentração de polissacarídeo A, C e W de <i>Neisseria meningitidis</i> immobilizados nas microesferas.....	49
5.3.2.	Avaliação do acoplamento do PSA, PSC e PSW com a microesfera carboxilada pela mimetização com Ácido Gálico.....	29

5.4.	Detecção e quantificação dos anticorpos induzidos pelos polissacarídeos dos grupos A, C e W de <i>Neisseria meningitidis</i> combinados na vacina Menveo® pela tecnologia multiparamétrica baseada em microesferas.....	52
5.5.	Controle de qualidade.....	52
5.6.	Cálculo do <i>Cutoff</i> do ELISA e da citometria de fluxo.....	53
5.7.	Análise estatística.....	53
6.	Resultados e Discussão.....	54
6.1.	Detecção dos níveis de IgG total para os polissacarídeos A, C e W de <i>Neisseria meningitidis</i> pelo teste de ELISA.....	54
6.2.	Padronização da concentração de polissacarídeo de <i>Neisseria meningitidis</i> grupos A, C e W para o acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na técnica de citometria de fluxo.....	56
6.3.	Cálculo do <i>Cutoff</i> do ELISA e da citometria de fluxo utilizados na pesquisa de anticorpos contra os polissacarídeos de <i>Neisseria meningitidis</i> grupos A, C e W	70
6.4.	Detecção e quantificação dos anticorpos induzidos pelos polissacarídeos dos grupos A, C e W de <i>Neisseria meningitidis</i> combinados na vacina Menveo® pela tecnologia multiparamétrica baseada em microesferas...	71
6.5.	Ensaio Monoparamétrico e Ensaio Multiparamétrico	73
7.	Conclusão.....	77
8.	Referências.....	79

## 1 - INTRODUÇÃO

A doença meningocócica é um problema de saúde pública mundial devido às elevadas taxas de letalidade. Ocorre endemicamente em todos os países do mundo, com alguns surtos epidêmicos (WHO, 2015; HOURI *et al* 2017), porém a doença é rara comparada com a alta prevalência de transmissão (KUGELBERG, GOLLAN & TANG, 2008). O agente causador, *Neisseria meningitidis*, foi isolado pela primeira vez por Anton Weichselbaum, que observou a bactéria no fluido cérebro-espinhal e deu o nome de *Diplococcus intracellularis* (WEICHSELBAUM, 1887).

Em países industrializados a incidência da doença invasiva, é de um a cinco casos por 100.000 indivíduos, porém é maior em países em desenvolvimento e durante epidemias em populações afetadas. Estima-se a ocorrência de pelo menos 500.000 casos da doença meningocócica por ano no mundo, com cerca de 50.000 óbitos. Geralmente acomete crianças e adultos jovens, mas em situações epidêmicas, a doença pode atingir pessoas de todas as faixas etárias (CARTWRIGHT, NOAH & PELTOLA, 2000; WHO, 2015; MACNEIL, BENNETT & FARLEY, 2015).

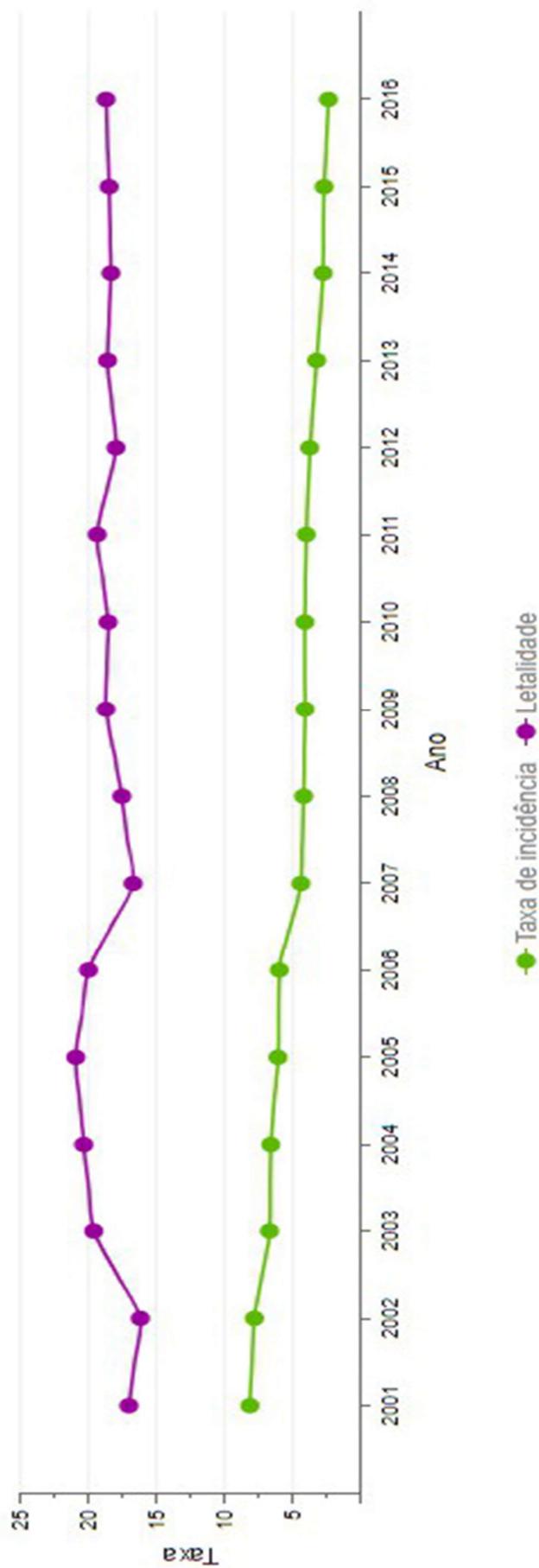
A maior frequência da enfermidade se registra na África sub-sahariana no chamado *cinturão da meningite*, que vai desde oeste do Senegal até a Etiópia (WHO, 2015.1). As epidemias ocorrem geralmente durante a estação seca, entre dezembro e junho. Um surto epidêmico pode demorar de dois a três anos, embora seja interrompido durante as estações chuvosas. Nesta região são comuns incidências de 100 a 800 casos em cada 100.000 pessoas, o que é agravado pela insuficiência de cuidados com a saúde. Nesta região se declaram epidemias a intervalos de 7 – 14 anos. A maior epidemia de meningite registrada na História varreu a região entre 1996 e 1997, causando mais de 250.000 casos e 25.000 mortes (BATISTA *et al*, 2017).

São conhecidos treze grupos de *Neisseria meningitidis* de acordo com a estrutura química de sua cápsula polissacarídica, porém apenas seis causam doenças invasivas, são eles: A, B, C, W, X e Y (SÁFADI & BARROS, 2006). A prevalência entre os grupos de *Neisseria meningitidis* difere dentro e entre os países, variando de acordo com a faixa etária, distribuição dos grupos e o período do ano, aumentando durante a infância, tendo um segundo pico entre os 15 - 24 anos (SORIANO-GABARRÓ *et al*, 2011; KOUTANGNI, BOUBACAR & MUELLER, 2015). Os grupos C e Y são responsáveis pela maior parte das doenças invasivas em países industrializados, juntamente com o grupo B (PACE, POLLARD & MESSONUR, 2009, SORIANO-GABARRÓ *et al*, 2011).

Com o advento das campanhas de vacinação coletivas, a proporção do grupo A reduziu drasticamente e o panorama de incidência dos grupos na África foi modificado (WHO, 2015.1). O grupo W tem sido reconhecido como responsável por surtos da doença meningocócica na África. A situação epidemiológica vem se complicando, devido a um encontro anual de peregrinos, em Hajj, que culminou em um surto da doença. A cepa responsável pelo surto se espalhou por outros países, gerando uma grande epidemia em Burkina Faso, no ano de 2002 (TAHA *et al*, 2004; GIRARD *et al*, 2006; STEPHENS, 2007; HARRISON, 2009). Durante o período de 2009 e 2010, foram identificados, aproximadamente 462 casos no sul da África (HALPERIN *et al*, 2011). Casos de doença causados pelo grupo W também têm sido observados na América do Sul, onde a Argentina e o Chile são os países com o maior percentual de casos, totalizando 60% em 2012 (HARRISON, TROTTER & RAMSEY, 2009; HALPERIN *et al*, 2011; SÁFADI, BEREZIN & OSELKA, 2012).

No Brasil, 8% de casos associados ao grupo W foram relatados recentemente, em diferentes estados. Entretanto, atualmente o C é o grupo prevalente no país, com 70% de casos registrados em 2014, seguido de 19% de casos de doença causados pelo grupo B (HALPERIN, 2011; SÁFADI, 2012; SINAN, acessado em 2015). Num panorama geral, segundo dados da Sociedade Brasileira de Imunizações a meningite bacteriana, no Brasil, apesar da queda no número de casos, a letalidade permanece alta, onde uma a cada cinco pessoas infectadas morrem (Figura 1).

## Meningite Bacteriana - Taxa por 100.000 hab/ano e percentual de óbitos



Fonte: SINAN / SIM / IBGE NOTAS: (1) Dados atualizados em 02/06/2017 (2) Dados processados pelas áreas técnicas

**Figura 1** - Meningite bacteriana no Brasil – Taxa por 100.000 habitantes por ano e percentual de óbitos – A taxa de incidência é representada pela linha verde, onde é observado ao longo dos anos o decaimento do contágio da meningite bacteriana, porém é uma doença letal, conforme mostra a linha roxa, levando a óbito, anualmente um percentual de 15-20%.  
<https://familia.sbim.org.br/doencas/88-doenca-meningococica-dm>. Acesso em 03.11.2018.

É uma doença silenciosa, agressiva, e quando não leva a óbito, deixa sequelas irreversíveis em suas vítimas. No mundo inteiro, as comunidades científicas têm os olhos voltados para o desenvolvimento de novos tratamentos, tais como o desenvolvimento de vacinas, para que sejam eficazes no combate desta moléstia.

A metodologia padrão utilizada para avaliação imunológica contra *Neisseria meningitidis* é o SBA (*Serum Bactericidal Antibody*), onde determina-se a funcionalidade do anticorpo, porém o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), tem sido largamente utilizado nos estudos pré-clínicos e clínicos para avaliação de potência e estabilidade da vacina ao longo do seu desenvolvimento. Apesar do ELISA ser amplamente utilizado, apresenta algumas desvantagens, tais como, ser uma técnica laboriosa, apresentar um coeficiente de variação alto e o ensaio possibilitar a avaliação de um único parâmetro por vez. É de extrema relevância que seja implementado novas formas de utilizações tecnológicas, como a avaliação multiparamétrica, para que possam auxiliar no diagnóstico rápido dos testes sorológicos feitos nos estudos laboratoriais pré-clínicos e clínicos. A tecnologia multiparamétrica por citometria de fluxo, pode ser uma alternativa para avaliação da resposta imunológica induzida por antígenos combinados em um único teste, bem como uma metodologia alternativa para a substituição do ELISA. (LAL *et al*, 2005).

## **2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – HISTÓRIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA**

Em Genebra (Suíça), no ano de 1805 registrou -se a primeira epidemia de meningite cérebro-espinhal, pelo médico Vieusseux. Um ano depois, a doença então denominada “meningite cérebro-espinhal epidêmica”, foi registrada também em Medfield (Massachusetts, EUA) por Danielson & Mann (1806). Em 1806-1815 a doença acometeu militares franceses e alemães e se disseminou nas populações civis. A história do século XIX mostra que a meningite cérebro-espinhal epidêmica era comum entre as tropas militares, registrando dezenas a centenas de casos ao ano (REQUEJO, 2005).

A duração das epidemias era extremamente variável, em geral bastante longa, e não escolhia raça ou nível sócio-econômico. Condições climáticas favoráveis e a imediata existência do agente etiológico eram suficientes para surgirem epidemias (REQUEJO, 2005).

Em 1887, o médico austríaco Weichselbaum, analisando casos de meningite cérebro-espinhal epidêmica, descreveu pela primeira vez a ocorrência no líquido cefalorraquidiano,

de bactérias pareadas com faces achatadas, que eram encontradas no geral dentro de células sanguíneas. Denominou-as então *Diplococcus intracelulares meningitidis* e o termo *meningococcus* de Weichselbaum passou a ser relatado na literatura pertinente (WEICHSELBAUM,1887). Admitia Weichselbaum, que o agente patogênico penetrava no organismo humano pelas vias respiratórias, de onde chegava à medula espinhal, causando a meningite (REQUEJO, 2005; GRANOFF, HARRISON & BORROW, 2008).

Na época da descoberta do meningococo, o método de coloração tintorial para observação microscópica de bactérias já estava em uso (coloração de Gram). As culturas para isolamento e identificação do meningococo de Weichselbaum (diplococo Gram negativo) foram introduzidos por Lingelsheim, durante a epidemia alemã de 1904 - 1905. Jaeger, também nessa época, introduziu a produção de antissoros meningocócicos em coelhos, para o emprego na caracterização sorológica das cepas epidêmica. Em 1905, Jockmann iniciou os estudos experimentais na produção de um soro específico para a cura da meningite meningocócica, propondo então a Companhia Merck, a sua produção em cavalos (REQUEJO, 2005).

Em 1915, foi adotado internacionalmente um conceito preciso sobre a identificação sorológica das cepas de meningococos. Nos Estados Unidos e na Inglaterra era adotado a princípio a classificação de Gordon, na qual os meningococos eram definidos em tipos I, II, III e IV, pelo teste de aglutinação com antissoros monovalentes produzidos por cavalos. Os meningococos tipos I e III eram os mais virulentos e prevalentes nas epidemias, enquanto a maioria dos casos esporádicos ou endêmicos era causada por organismos menos virulentos, do tipo II. Na França as cepas isoladas eram submetidas ao teste de aglutinação com os soros denominados A, B, C e D. A maioria das cepas eram do grupo A. Os tipos I, II, III e IV de Gordon correspondiam aos grupos A, B, C e D da nomenclatura francesa (REQUEJO, 2005).

A soroterapia permaneceu em uso até os anos de 1930, quando foram descobertas as sulfonamidas e em 1940, na Segunda Guerra Mundial, foi introduzida a penicilina como nova alternativa de tratamento para a meningite meningocócica (REQUEJO, 2005; GRANOFF, HARRISON & BORROW, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo cronológico da doença meningocócica

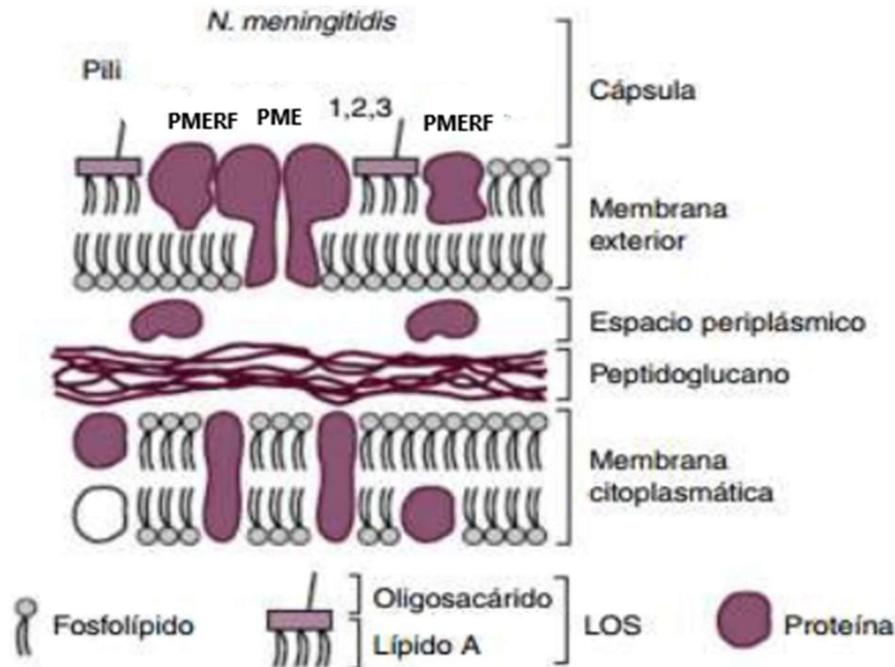
Ano	Evento
1805	1ª Epidemia em Genebra
1806	Foi denominada “meningite cérebro-espinhal epidêmica”
1840	1º relato de casos da doença na África
1884	Identificados os sintomas da meningite, pelos médicos Vladimir Kerning e Josef Brudzinski
1884	Marchiava e Cheli -identificação e descrição da bactéria
1887	Weichselbaum – via de penetração do agente patogênico no organismo humano - vias respiratórias.
1891	Heinrich Quincke - técnica de punção lombar
1905 - 1908	Primeira epidemia africana (Nigéria e Gana)
1904 -1905	Jaeger e Jocker - Produção de soro
1906	Primeiros casos registrados no Brasil (em São Paulo)
1915	Identificação sorológica das cepas de meningococos
1920 - 1925	Epidemia brasileira causada pelo grupo A
1930	Descoberta das sulfonamidas
1940	Introdução da penicilina como alternativa de cura
1945 - 1951	Epidemia brasileira causada pelo grupo A
1969	Gotschlich - Anticorpos séricos bactericidas
1971 - 1977	Maior epidemia brasileira causada pelos grupos A e C
1987 - 1989	Vacina OMV foi avaliada em Cuba VA-MENGOC-BC
1988 - 2002	Epidemia brasileira causada pelos grupos B e C
1990 - 2000	Surtos nas regiões sul e sudeste do Brasil
1995	Descoberta dos grupos Y, W e X
Fim década de 90	Vacinas meningocócicas C conjugadas
1999	Reino Unido – 1º país a introduzir um PNI (MenC conjugada)
2005	EUA - a vacina quadrivalente ACWY (MenACWY)
2005 - 2007	Vacinas brasileiras contra os meningococos dos grupos B e C
2010	África - MenA conjugada introduzida no Cinturão africano
2018	Início do estudo clínico de Fase III da Vacina Meningocócica C conjugada

(adaptada, resumo histórico autora)

## 2.2 – ETIOLOGIA

A doença meningocócica é uma doença invasiva causada pelo diplococo Gram negativo encapsulado, *Neisseria meningitidis*. Sua cápsula polissacarídica tem como principal fator de virulência o ácido siálico, uma proteção contra a fagocitose e opsonização. Não formam esporos ou possuem flagelos na superfície externa. A presença de fimbrias (*pili*) é notada com

frequência, porém as células são imóveis. A cápsula é composta por uma longa cadeia de carboidratos, chamados de polissacarídeos capsulares, os quais possuem um lipídio numa extremidade (CALLE, SÁNCHEZ & MARTINÓN-TORRES, 2015) (Figura 2).



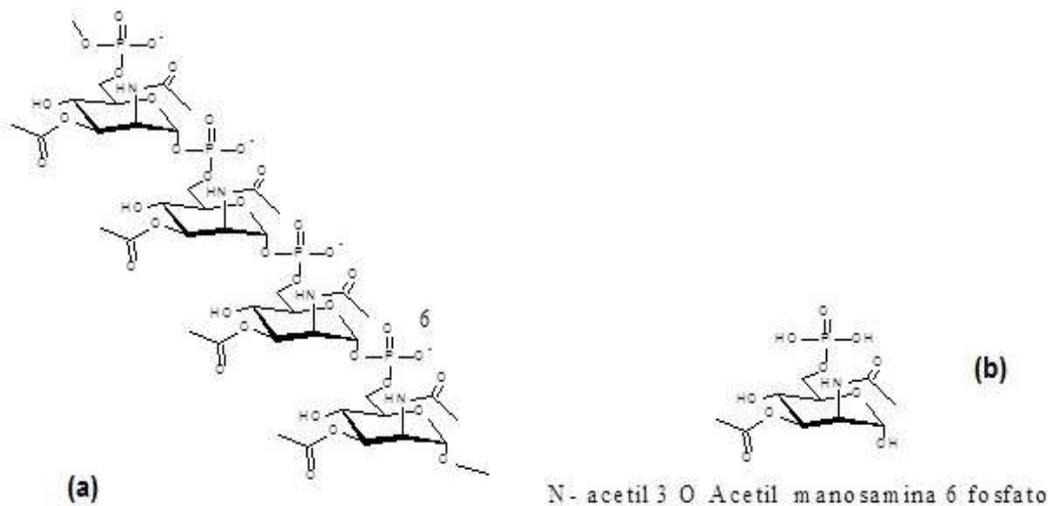
**Figura 2** – Esquema de membrana da *Neisseria meningitidis* – Reprodução de Moraga, F. – Enfermedad Meningocócica: Passado, Presente e Futuro (2013). PMERF (Proteína de Membrana Externa Regulada pelo Ferro); PME (Proteína de Membrana Externa).

São conhecidos 13 grupos de *Neisseria meningitidis* baseados nos diferentes polissacarídeos capsulares, mas apenas 6 (A, B, C, W, X e Y) causam a maioria das manifestações fatais em todo o mundo (Tabela 2) (Figuras 3 – 5). Os demais grupos excepcionalmente causam doença invasiva, porém o grupo X emergiu na década de 2000 como causa de epidemia em alguns países da África: Niger, Uganda, Kenya, Togo e Burkina Faso (SÁFADI & BARROS, 2006). Os grupos são baseados na especificidade imunológica dos polissacarídeos capsulares, onde os grupos B e C são homopolímeros de ácido N-acetilneurâmico. Cápsulas do grupo Y e W são compostos por elementos repetidos de dissacarídeos ácido siálico e D-glicose ou D-galactose. O grupo A é N-acetilmanosamina-6-fosfato e grupo X de N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato (RAYMOND, 2012).

**Tabela 2** - Estrutura química dos polissacarídeos encontrados nos grupos mais frequentemente relacionados com a doença meningocócica.

Grupo	Unidade	Ligação	Localização do O-acetil
A	$\rightarrow 6\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Man-p-Nac-1(PO}_4\text{)}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(1\rightarrow 6)$	C-3 de manosamina
B	$\rightarrow 8\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Neu-p-Nac-(2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 8)$	Ausente
C	$\rightarrow 9\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Neu-p-Nac-(2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 9)$	C-7 e C-8 do ácido siálico
Y	$\rightarrow 6\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Glc-p-(1}\rightarrow 4\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Neu-p-Nac-2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 6)$	C-3 e C-4 da Glc; C-7 do ácido siálico
W	$\rightarrow 6\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Gal-p-(1}\rightarrow 4\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Neu-p-Nac-2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 6)$	Ausente
X	$4\text{-})\text{-}\alpha\text{-D-Glc-p-Nac-1(PO}_4\text{)}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(1\rightarrow 6)$	Ausente

Adaptado de LEMERCINIER & JONES (1996)



### POLISSACARÍDEO MENINGOCÓCICO A

### MONÔMERO POLI A

Figura 3: Estrutura molecular do polissacarídeo meningocócico A (a) e monômero Poli A (b)

Manosamina-6-fosfato (2- amino-2-deoxi-6- fosfato -  $\beta\text{-D-Manopiranoose } \beta\text{-D-ManN-6-PO}_3\text{H}_2$ )

(POLLARD & GOLDBLATT, 2001).

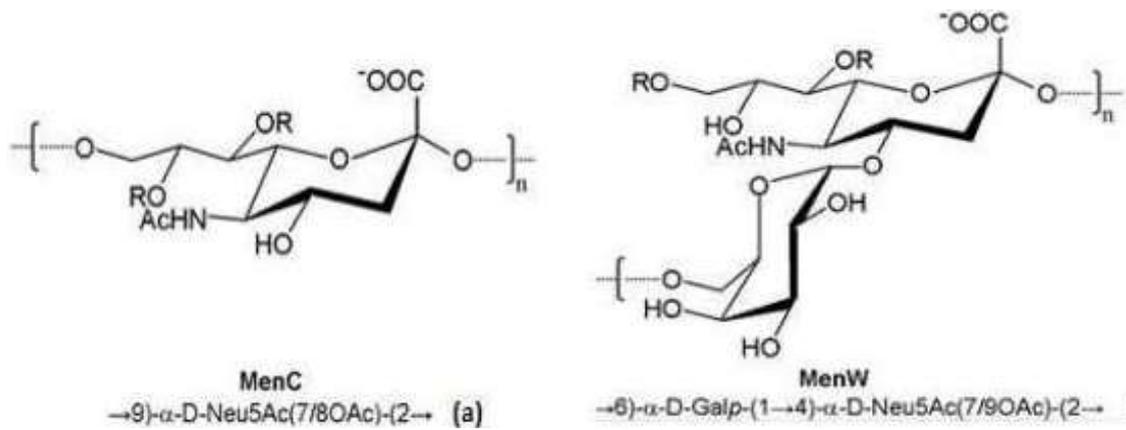


Figura 4: Estrutura molecular monomérica dos (a) Polissacarídeos C ( $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-NeupNac}\text{-}(2\rightarrow$ ) e (b) W ( $\rightarrow 6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-NeupNac}\text{-}2\rightarrow$ ) (GUDLAVALLETI *et al*, 2007).

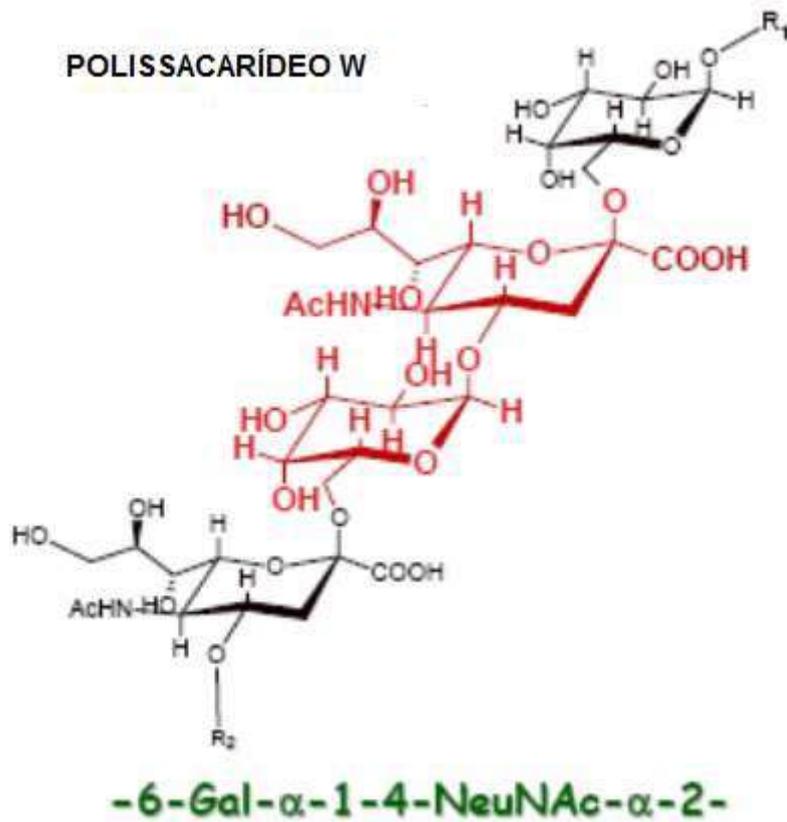


FIGURA 5: Polissacarídeo Meningococo W.

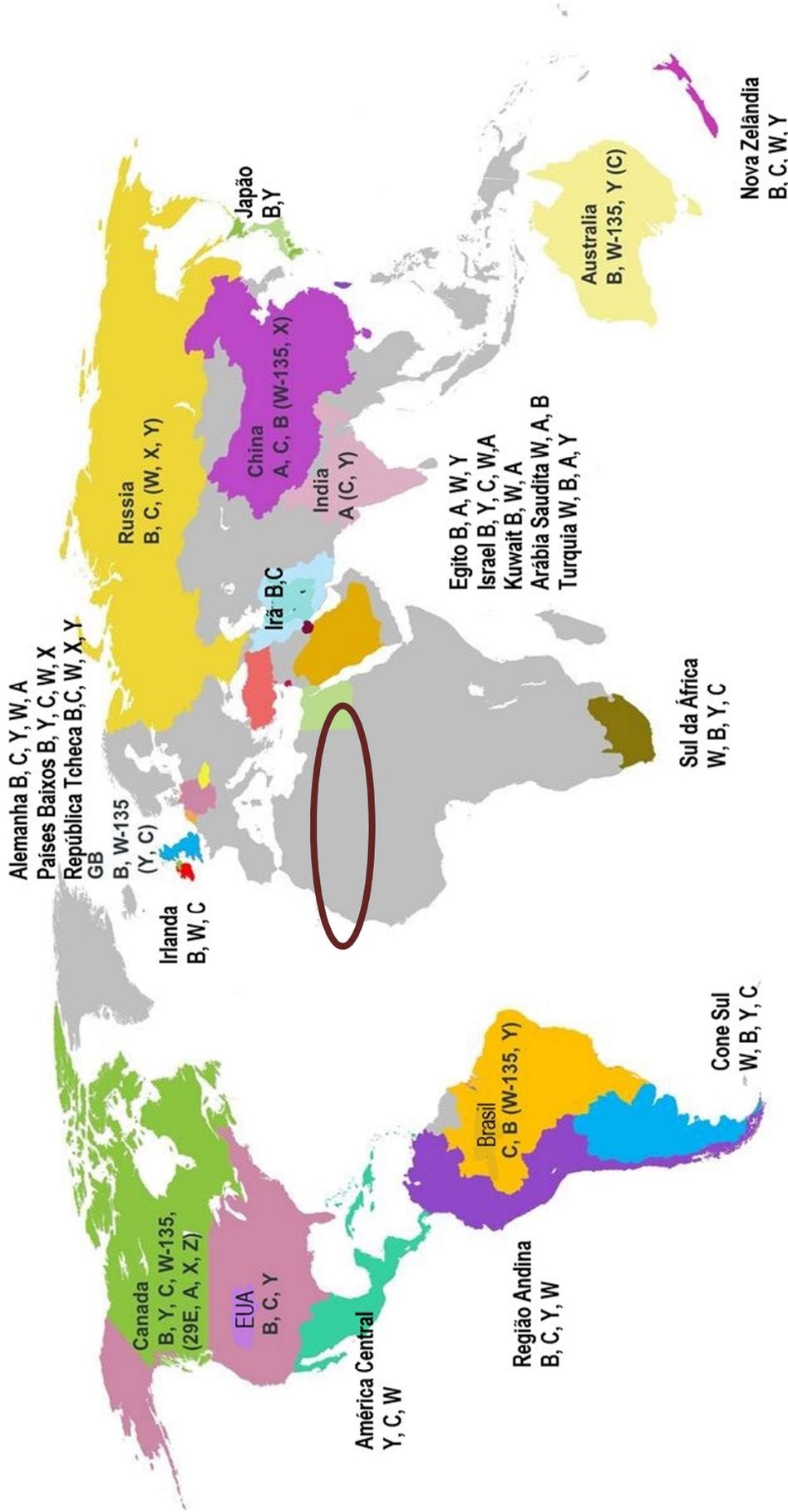
## 2.3 – EPIDEMIOLOGIA

### 2.3.1 – Distribuição geográfica e sazonal

A doença meningocócica é caracterizada pela sua sazonalidade, e a maior parte dos casos é registrada no inverno e princípio da primavera (MOORE *et al*, 1992; FISHER *et al*, 1997; KOUTANGHI, BOUBACAR & MUELLER, 2015). Outros fatores influenciam a incidência e a prevalência da doença como: lugares com baixa circulação de ar, aglomerações, condições precárias de higiene, susceptibilidade de uma dada população à bactéria, tabagismo, fatores climáticos (temperatura e umidade relativa do ar), migrações e infecções virais repetidas (MOORE, 1992; FISHER *et al*, 1997). Nos Estados Unidos, Europa e Austrália, a doença tende a ser endêmica, com uma incidência estimada de três casos por 100.000 habitantes (HARRISON, TROTTER & RAMSAY, 2009; HALPERIN *et al*, 2011; BATISTA *et al*, 2017).

A epidemiologia da enfermidade varia de acordo com a área geográfica e o grupo:

- Grupo A – responsável pelas grandes epidemias na África;
- Grupo B e C – predominante nos países industrializados, sendo os responsáveis pela maioria dos casos na Europa e continente americano;
- Grupo W – tem provocado epidemias, como na Arábia Saudita, e países do *cinturão africano*, e tem sido o grupo mais frequente na Argentina;
- Grupo Y – é causa mais comum da doença meningocócica nos Estados Unidos e Colômbia, e é muito frequente no Canadá e Israel;
- Grupo X – tem produzido epidemias em Gana e outros países africanos (CALLE, SANCHEZ & MARTINÓN-TORRES, 2015) (Figura 6).



**Figura 6** – Distribuição global dos grupos de *Neisseria meningitidis*.  Sinturão da Meningite. Adaptado de MILLAR, MOORE & MOORE, 2017.

## 2.4 – Vacinas meningocócicas

As primeiras vacinas experimentais contra *Neisseria meningitidis* foram baseadas na partícula bacteriana completa, inativada pelo calor, porém induziram reações adversas graves, provavelmente devido ao elevado teor da endotoxina, sem uma eficácia satisfatória (MORLEY & POLLARD, 2001).

O principal fator de virulência da *Neisseria meningitidis* é a capsula polissacarídica, por isso é utilizada para o desenvolvimento de estratégias vacinais para a maioria dos grupos (ROSENSTEIN, 2001).

Os polissacarídeos meningocócicos foram as primeiras vacinas bacterianas quimicamente definidas. Vacinas baseadas em polissacarídeos de alto peso molecular foram desenvolvidas no Walter Reed Army Institute e usadas em recrutas para prevenir surtos recorrentes entre os soldados na década de 1960 (FRASCH *et al*, 1995).

As vacinas polissacarídicas se mostraram imunogênicas em adultos e em crianças acima de dois anos de idade e foram objeto de vários ensaios clínicos em países da Europa, Américas e África. Os polissacarídeos são antígenos linfócitos T independentes e a capacidade de responder a estas moléculas depende da maturidade imunológica relacionada com a idade do indivíduo (FRASCH *et al*, 1995).

A principal desvantagem das vacinas polissacarídicas é sua incapacidade de induzir células de memória, levando a uma resposta fraca ao reforço e à curta duração da proteção. O polissacarídeo A de *Neisseria meningitidis*, no entanto, induz resposta em crianças com três meses de idade e apresenta efeito de reforço após uma segunda dose. Acredita-se que este efeito não caracteriza uma resposta imunológica do tipo secundária e sim uma maior capacidade desta molécula de estimular linfócitos B primados por contatos anteriores com o polissacarídeo ou antígenos que apresentam com ele, reatividade cruzada (FRASCH *et al*, 1995). A fraca resposta (conforme definido por respostas de anticorpos anti-capsulares séricos são prejudicados quando administradas dose reforço) à vacina de polissacarídeos do grupo C na infância foi mostrada, especialmente se as doses forem repetidas mais de uma vez. Esta resposta não foi observada no uso da Vacina Meningocócica C Conjugada (ALI *et al*, 2014).

As vacinas polissacarídicas têm sido muito utilizadas em programas de vacinação de rotina em alguns países, tais como Síria e Arábia Saudita, com o objetivo de proteger pessoas com maior risco de doença, como por exemplo, esplenectomia, viajantes para a peregrinação muçulmana anual (Haji), ou em campanhas de vacinação reativa em resposta a surtos (ALI *et al*, 2014). Ainda hoje as vacinas polissacarídicas contra *Neisseria meningitidis* são produzidas e utilizadas no mundo em epidemias e surtos epidêmicos. Na China, a vacina polissacarídica

do grupo A é utilizada no programa de imunização de rotina desde 1982, embora a vacina de polissacarídica bivalente (A, C) tenha sido introduzida em 2005 após os surtos do grupo C (ALI *et al*, 2014).

Como a doença meningocócica tem prevalência em crianças de faixa etária inferior a dois anos, em todo o mundo, a utilização de antígenos T-independentes como vacinas, não induzem a proteção duradoura. Apesar de estar largamente comprovada a eficácia destas vacinas no controle de surtos e epidemias em adultos, novas abordagens têm sido propostas para modificação destas moléculas na busca de mudança da natureza da resposta imunológica por elas induzida (SILVEIRA *et al*, 2007; PRICE *et al*, 2015).

Nas últimas décadas, novos conhecimentos no campo da imunologia e na tecnologia de produção de vacinas, levaram ao desenvolvimento de vacinas conjugadas (BRUGE *et al*, 2004). A conjugação química de polissacarídeos bacterianos a proteínas carreadoras tem contribuído para o aumento da resposta imunológica contra polissacarídeos capsulares e na prevenção de doenças causadas por bactérias como a *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Na vacina brasileira contra o grupo C (MenCPS-TT), desenvolvida em Bio-Manguinhos, foi utilizado um método modificado de aminação redutiva, onde a reação de conjugação a proteína monomérica tetânica (PMT), foi realizada num período de duração menor (*overnight*) (JENNINGS & LUGOWSKI, 1981; LEE & FRASCH, 2001; JESSOUROUN *et al*, 2005; SILVEIRA *et al*, 2007). A imunogenicidade da vacina conjugada brasileira foi avaliada pela detecção de anticorpos incluindo o índice de avides e a atividade bactericida. Os animais imunizados apresentaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos após a terceira dose quando comparado ao período pré-imunização, que pode ser observado pelo ELISA e pelo método de análise de anticorpos bactericida (SILVEIRA *et al*, 2007). Esta vacina apresentou resultados satisfatórios de reatogenicidade e imunogenicidade em indivíduos saudáveis, em estudos clínicos de Fase I (2009) e Fase II (2012), em comparação com a vacina comercial (Baxter). O processo produtivo foi escalonado na Fase II / III, com a fabricação de três lotes consecutivos em escala industrial da vacina (BASTOS *et al*, 2015). A metodologia modificada de aminação redutiva foi empregada para obtenção de uma vacina conjugada contra o grupo W e outra contra o grupo A, para a promoção de campanhas de vacinação na África (LEE & FRASCH, 2001; BORROW *et al*, 2006; GIRARD *et al*, 2006; GUDLAVALLETI *et al*, 2007; LEE *et al*, 2009).

Tal metodologia será aplicada para obtenção de conjugados contendo o polissacarídeo meningocócico do grupo W e outros polissacarídeos bacterianos de

interesse epidemiológico no Brasil, consolidando assim uma plataforma tecnológica para obtenção de vacinas, utilizando o método modificado de aminação reductiva e a Proteína Monomérica Tetânica (PMT) como carreadora (SILVEIRA *et al*, 2007).

Algumas vacinas conjugadas estão disponíveis comercialmente, nas formas monovalentes ou combinadas a outros grupos de meningococos. Na forma monovalente temos: Menjugate® e Meningitec® (grupo C conjugada à uma variante atóxica da toxina diftérica CRM197); Neisvac® (grupo C conjugada à anatoxina tetânica); MenAfriVac® (grupo A conjugado à anatoxina tetânica). Na modalidade tetravalente, Menveo® e Menactra® (grupos A, C, W e Y conjugadas à CRM197 e anatoxina diftérica, respectivamente); Nimenrix® (grupos A, C, W e Y conjugados à anatoxina tetânica) (BORROW *et al*, 2013, PICCINI *et al*, 2016). Nos Estados Unidos, a vacina tetravalente ACWY (MenACWY) foi recomendada pelo Comitê Consultivo em Práticas de Imunização (do inglês, *Advisory Committee on Immunization Practices - ACIP*) dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças, em 2005, para os indivíduos com idade entre 11-12 anos. Em atualização, a partir do ACIP 2011, recomenda-se a administração de uma dose de reforço aos 16 anos. Uma vacina conjugada combinada contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib) e o meningococo grupo C, produzida pela GSK (Menitorix®) já está disponível no Reino Unido. Esta empresa também desenvolveu uma vacina contendo os polissacarídeos de Hib e meningocócicos C e Y conjugados à proteína tetânica (MenHibrix®) licenciada em 2012 nos Estados Unidos (PERRETT *et al*, 2012). Mais recentemente, teve início a pentavalente contra os grupos A, C, W, Y e X para uso na África. A licença desta vacina deverá ser obtida entre 2019 e 2020 (WHO, 2015; LAFORCE, 2018).

Enquanto as vacinas polissacarídicas contra os grupos A, C, Y e W, se mostram parcialmente eficazes, o mesmo não acontece para o polissacarídeo do grupo B. (GONZÁLEZ *et al*, 2006) O polissacarídeo do grupo B não é imunogênico por apresentar uma identidade química semelhante a antígenos de superfície das células neurais humanas. A tentativa de aumentar a imunogenicidade poderia levar a indução de autoanticorpos que apresentariam reação cruzada com antígenos glicosilados do hospedeiro, principalmente com o tecido cerebral fetal (SEGAL & POLLARD, 2004).

Vacinas alternativas têm sido propostas contra o grupo B de acordo com observações de que anticorpos bactericidas protetores são induzidos preferencialmente contra antígenos não capsulares.

As vesículas de membrana externa (VME) por serem complexos antigênicos do envoltório bacteriano têm sido largamente estudadas para este fim. Várias pesquisas têm sido realizadas sobre vesículas de membrana externa e lipooligossacarídeo detoxificado (dLOS) como imunógenos alternativos. Estas vacinas têm mostrado uma segurança aceitável e induz anticorpos funcionais como avaliados pela indução de anticorpos bactericidas (GONZÁLEZ *et al*, 2006; RUIJINE *et al*, 2006; JESSOUROUN *et al*, 2004; ALI *et al*, 2014).

O papel das VMEs no plasma e no fluído cerebrospinal tem sido de grande importância. Acredita-se que o lipooligossacarídeo nativo (LOS) na corrente sanguínea é o principal fator pró-inflamatório produzido pela *Neisseria meningitidis*, além de aumentar os níveis de anticorpos bactericidas e a especificidade da vacina quando combinado com VMEs tratadas com deoxicolato de sódio (MIRLASHARI *et al*, 2002; QUAKYI, HOCHSTEIN & TSAI, 1997).

A vacina cubana (VA-MENGOC-B/C) foi elaborada a partir de uma cepa de *Neisseria meningitidis* grupo B, sorotipo 4 e subtipo P1.15, prevalente no país. Ela é composta por 50 µg de VME e a mesma quantidade do polissacarídeo C combinados a 2mg de hidróxido de alumínio. Esta vacina é administrada em duas doses com intervalo de seis a oito semanas. Em estudo duplo cego, foi observada uma eficácia de 79,8% em adolescentes e de 94,5% em população de 6 meses a 24 anos de idade. Em ensaio clínico no Brasil, realizado entre 1989 e 1991, a vacina cubana apresentou proteção variável de acordo com a idade do grupo vacinada (JESSOUROUN *et al*, 2004).

A vacina contra *Neisseria meningitidis* grupo B brasileira que consiste na associação de VMEs e dLOS foi elaborada a partir das duas cepas mais prevalentes no Brasil (N44/89 e N603/95). Nos estudos pré-clínicos realizados em camundongos suíços hiperferrêmicos, onde foram comparados o grupo imunizado pela vacina brasileira e o grupo imunizado pela vacina de referência cubana (VA-MENGOC-BC), observamos um aumento significativo na razão de sobrevivência quando comparadas ao grupo de camundongos não imunizados, apresentando uma eficiência similar na eliminação da bactéria. Com relação aos anticorpos bactericidas tanto o grupo imunizado com a vacina brasileira completa (VME + dLOS) quanto aquele imunizado com VME apenas apresentou altos títulos de anticorpos bactericidas superiores a aqueles induzidos pela vacina de referência. A vacina brasileira completa induziu a uma proteção cruzada superior a vacina de referência, a qual tem o polissacarídeo do grupo C como um componente vacinal, apresentando altos títulos bactericidas contra

a cepa heteróloga C (JESSOUROUN *et al*, 2004).

Acredita-se que o diferente perfil das proteínas de VME usadas na vacina brasileira pode ter induzido diferentes respostas de anticorpos bactericidas, apesar da cepa de maior prevalência brasileira e a cepa cubana pertencerem ao mesmo sorotipo. Nossos resultados sugerem que a combinação da VMEs + dLOS pode ter também aumentado a especificidade da resposta imunológica (JESSOUROUN *et al*, 2004).

Em 2013, a vacina Bexsero®, desenvolvida pela farmacêutica Novartis, começou a ser comercializada na Europa, Canadá e Austrália. Sua abordagem é baseada na Vacinologia Reversa e é composta por três proteínas recombinantes, proteína de fusão ligante do fator H (fHbp), proteína de adesão (NadA) e proteína de fusão ligante de Heparina (NHBA) de *Neisseria meningitidis*, a partir da VME da cepa NZ98/254 da Nova Zelândia (JOSEFSBERG & BUCKLAND, 2012; BORROW *et al*, 2013). No ano seguinte, o FDA (*Food and Drug Administration*) licenciou uma outra vacina protéica para comercialização contra *Neisseria meningitidis* grupo B, a Trumenba® (Pfizer), composta por variantes da proteína fHbp pertencentes às subfamílias A e B (SRIDHAR *et al*, 2015; GASPARINI *et al*, 2015).

Nos Estados Unidos, o ACIP (Comitê Consultivo em Práticas de Imunização) também recomendou (em 2015) uma série de vacinas MenB (meningocócicas B) que podem ser administradas em adolescentes e adultos jovens com idades entre 16 a 23 anos para fornecer proteção de curto prazo contra a maioria das cepas causadoras da doença meningocócica do grupo B; a idade preferencial para a vacinação é de 16 a 18 anos. O ACIP também recomenda a vacinação com uma vacina MenB de pessoas em situação de risco com idade a partir de 10 anos. As vacinas MenB atualmente aprovadas nos Estados Unidos são rLP2086 bivalente (Trumenba, MenB-FHbp) e 4CMenB (Bexsero; MenB-4C) (PELTON, 2016).

#### **2.4.1 – Resposta imunológica aos polissacarídeos**

Os antígenos são classificados como imunógenos T-dependentes (timo-dependentes) e T-independentes (timo-independentes) conforme o envolvimento dos linfócitos T na produção de anticorpos. Os antígenos proteicos por induzirem as células T-auxiliares para a síntese de anticorpos, são antígenos T-dependentes. Esses antígenos são reconhecidos e processados em primeiro lugar pelos macrófagos e então apresentados aos linfócitos T. Os linfócitos T ativados induzem a proliferação e diferenciação de subpopulações de linfócitos B de memória para

indução da resposta antígeno-específica. Esses linfócitos B mantêm a memória necessária para subsequente resposta de reforço (MOLINARO, 2009; REQUEJO, 2005).

Através das citocinas, os linfócitos T-auxiliares regulam:

- Magnitude da resposta imune, especialmente em crianças lactentes;
- Mudança de classe das imunoglobulinas, de IgM para IgG;
- Atividade funcional do anticorpo;
- Capacidade de memória.

Os polissacarídeos consistem de unidades repetidas de oligossacarídeos e são classificados como antígenos T-independentes, visto que a resposta imunológica acontece através da apresentação direta do antígeno aos linfócitos B, sem a participação dos linfócitos T-auxiliares. Não são capazes de estimular clones de células de memória resultando numa baixa eficácia das vacinas polissacarídicas (MOLINARO, 2009; REQUEJO, 2005).

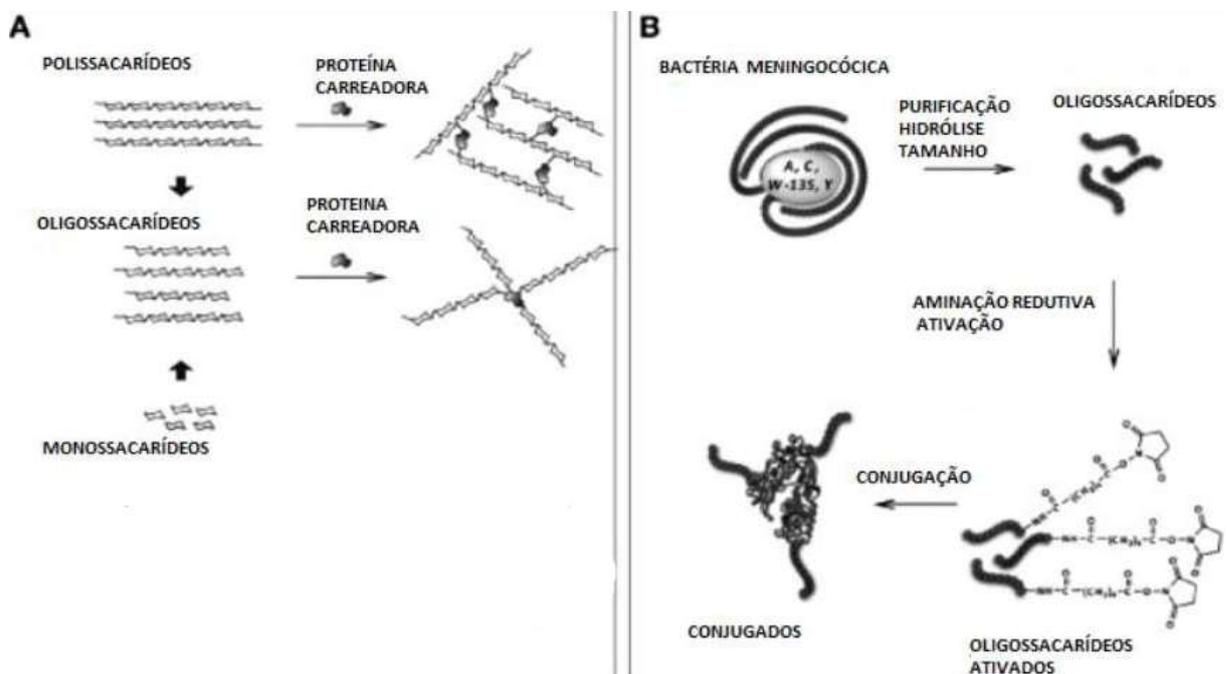
As vacinas polissacarídicas disponíveis no Brasil há cerca de 40 anos, oferecem proteção contra os grupos A e C de *Neisseria meningitidis*. Em crianças abaixo de dois anos, essas vacinas não geram resposta imunológica adequada devido à ausência de resposta consistente a antígenos T independentes nessa faixa etária. Acima de dois anos de idade, a proteção conferida é de duração limitada, não sendo capazes de induzir memória imunológica (GRANOFF, HARRISON & BORROW, 2008).

Em geral, as vacinas polissacarídicas apresentam as seguintes características imunológicas T-independentes do tipo 2:

- Uma resposta imunológica tardia na infância;
- Uma resposta imunológica limitada e quantitativamente variável;
- Uma resposta imunológica de um isotipo restrito com predomínio de IgM e alguma subclasse de IgG;
- Perda de reforço ou anamnésica com o desafio antigênico secundário (MOLINARO, 2009; REQUEJO, 2005).

Para que um polissacarídeo seja imunogênico e protetor é então necessária a conjugação desta molécula a uma proteína carreadora (antígeno T-dependente). Na

conjugação, o polissacarídeo que é considerado um hapteno, é covalentemente ligado a um imunógeno T-dependente para aumentar sua imunogenicidade. A conjugação estimula o auxílio de linfócitos T, levando a uma resposta T-dependente aos polissacarídeos. Além disso, devido à sua capacidade para recrutar linfócitos T, a molécula conjugada também estimula resposta em crianças que não são capazes de responder à forma não-conjugada do polissacarídeo (MOND *et al*, 1995; SÁFADI, BEREZIN & OSELKA, 2012). A conjugação com proteínas carreadoras aumenta o reconhecimento por macrófagos e linfócitos T e a indução de anticorpos bactericidas (REQUEJO, 2005) (Figura 7).



**Figura 7.** Diferentes formas de produzir vacinas conjugadas. (A) Acoplamento de proteínas carreadoras a polissacarídeos aleatoriamente ativados, até grupos finais de oligossacarídeos ativados derivados de polissacarídeos nativos ou por síntese química. (B) Esquema da preparação de conjugados. A partir de polissacarídeos bacterianos, a hidrólise e o dimensionamento são realizados para obter os oligossacarídeos. Os oligossacarídeos são ativados introduzindo a fração de éster de N-hidroxissuccinimida e conjugados com as proteínas CRM<sub>197</sub>, TT e DT (TONTINE *et al*, 2013).

#### 2.4.2 – Mecanismos da resposta imunológica aos meningococos e métodos utilizados na avaliação

Componentes do sistema imunológico, tais como, anticorpos circulantes, citocinas e células B de memória representam um estado de responsividade e eliminação de micro-organismos invasores, bem como um sistema de alerta para que

as células imunológicas circulantes se concentrem no patógeno. A defesa contra bactérias encapsuladas baseia-se principalmente em células B presentes na zona marginal do baço. Essas células produzem anticorpos poli-reativos que desempenham um papel crucial nessa defesa. Os anticorpos geralmente realizam essa função com a ajuda do sistema complemento, especialmente se os organismos invasores são bactérias encapsuladas. Em pacientes com deficiências tardias dos componentes do sistema complemento, tanto os organismos encapsulados quanto os não encapsulados, especialmente *Neisseria meningitidis* são relatados como causadores de doenças como sepsis e meningite em uma frequência mais alta do que na população em geral (MCINTOSH *et al*, 2015). O meningococo possui várias adaptações importantes que lhe permitem sobreviver no hospedeiro humano: a presença da cápsula e a capacidade de se ligar ao fator H (fH), que é um inibidor da ativação do complemento. Normalmente, o fH é uma das proteínas reguladoras do sistema complemento da via alternativa que impede a ativação exacerbada do sistema evitando o comprometimento do hospedeiro. Pessoas com deficiências genéticas de fH têm ativação do sistema complemento descontrolada devido à incapacidade de regular a via alternativa. Mutações no gene estão associadas a doenças como a síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS) (MCINTOSH *et al* 2015). O meningococo aproveita sua capacidade de se ligar à fH para se proteger da ação da resposta imunológica inata. O meningococo abriga pelo menos três proteínas distintas em sua superfície para explorar a proteína de ligação fH: fHbp, proteína de superfície *Neisseria A* (NspA) e Porina B (PorB). Com essas proteínas, o organismo pode se ligar especificamente à fH humana - o organismo fica cercado de fH, que mantém o complemento C3b sob controle, diminuindo assim a ativação do complemento pelo sistema imunológico humano. Conseqüentemente, o meningococo é menos suscetível à lise dependente de anticorpos mediada pelo complemento (MCINTOSH *et al*, 2015).

A cápsula meningocócica também é conhecida por desempenhar um papel importante na evasão da lise mediada pelo sistema complemento e, além das proteínas da membrana externa, como a ligação da fHbp à fH, a própria cápsula regula negativamente a ativação do complemento e aumenta a resistência à atividade bactericida. Os níveis de expressão das proteínas de superfície que se ligam a fH afetam a suscetibilidade do organismo, isto é, aumenta a expressão da proteína na superfície bacteriana levando a uma maior resistência à morte e, enquanto que uma diminuição

na expressão, representa um aumento da suscetibilidade do micro-organismo (MCINTOSH *et al*, 2015).

A utilização do ensaio SBA (Pesquisa de anticorpos bactericidas no soro) para avaliar a funcionalidade dos anticorpos na proteção contra a doença meningocócica foi iniciada na década de 1960, quando, durante um surto de doença meningocócica invasiva do grupo C, em uma base do exército, Goldschneider e colegas (1969) avaliaram concentrações de anticorpos funcionais em recrutas recém-admitidos. O SBA demonstrou que os recrutas com uma quantidade definida de anticorpos meningocócicos funcionais circulantes tinham menor risco de doença, enquanto que aqueles com níveis abaixo dessa concentração estavam em maior risco. O ensaio SBA avalia a capacidade dos anticorpos de lisarem 50% das colônias bacterianas na presença de complemento. A persistência de títulos de anticorpos bactericidas séricos mostra-se mais importante que os títulos totais de IgG induzidos (SÁFADI, BEREZIN & OSELKA, 2012). Segundo McIntosh e colaboradores (2015), para o grupo C, um título SBA de  $\geq 4$  foi estabelecido como um correlato de proteção quando utilizando complemento humano (hSBA) e  $\geq 8$  com complemento de coelho recém-nascido, baseados em resultados comparativos dos métodos. Em um estudo subsequente de indivíduos vacinados, o teste de proteção norueguês com 172.000 adolescentes, chegou a uma conclusão semelhante: que um título hSBA de 4 é uma boa estimativa de proteção a curto e longo prazo (MCINTOSH *et al*, 2015).

Para substantiar a conclusão de que um título de  $\geq 4$  era o correlato de proteção contra doença meningocócica invasiva, Goldschneider e colaboradores (1969) também realizaram um estudo de base populacional, titulando anticorpos bactericidas a partir do soro de indivíduos desde a infância até a idade adulta. Existe uma relação inversa entre a presença de títulos SBA em 1:4 e a incidência da doença meningocócica invasiva, onde o importante é que haja a soro-proteção em face a doença. É importante ressaltar que o SBA foi avaliado para os grupos A, B e C, com todos os três correlacionando inversamente com a incidência da doença, embora a doença nos EUA tenha a incidência apenas dos grupos B e C. A atividade bactericida do soro avaliado pelo ensaio SBA tornou-se o correlato “padrão ouro” tanto da infecção quanto da imunização bem-sucedida. (MCINTOSH *et al*, 2015).

Além do ensaio SBA, o ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, tem sido muito utilizado em estudos pré-clínicos e clínicos, na avaliação da potência e da estabilidade, das vacinas meningocócicas conjugadas, para avaliar os títulos de IgG

total induzidos (SILVEIRA *et al*, 2007; JESSOUROUN *et al*, 2004).

O ELISA baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Nesse método, uma enzima conjugada a um anticorpo específico para IgG, reconhece o anticorpo ligado ao antígeno adsorvido na placa. Esta enzima ao entrar em contato com o substrato, catalisará a reação produzindo cor, se todo o complexo estiver formado após as etapas de lavagens (VAZ, TAKEY & BUENO, 2012) (Figura 8).



**Figura 8** - Esquema do ELISA indireto. O antígeno (▲) de interesse é imobilizado na placa por adsorção. A detecção do anticorpo específico (Y) é realizada por uma enzima conjugada a um anticorpo específico para IgG. A enzima ao entrar em contato com o substrato, catalisará a reação produzindo cor.

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/ELISAFormats575x214.jpg>

O ELISA apesar de ser um método muito sensível e eficiente como um teste de triagem na avaliação da resposta imunológica em estudos pré-clínicos e clínicos nas vacinas meningocócicas conjugadas, apresenta um coeficiente de variação de aproximadamente 30%, devido à natureza polissacarídica do antígeno adsorvido na placa (BUTLER, 2000). Quando são utilizados antígenos polissacarídicos na etapa de adsorção em placas de poliestireno, são necessárias pontes de ligação, tais como albumina humana metilada (mHSA) ou Poli-L-Lisina, para uma maior estabilidade do teste, devido a carga do polissacarídeo (GHEESLING *et al*, 1994). Como o coeficiente de variação de um ELISA, de antígeno proteico, que não necessita de ponte de ligação, já é alto (20%), com aumento de mais esta etapa, além de se tornar mais laborioso, podemos ter também, um aumento de 10% de variação entre as replicatas (BUTLER, 2000).

Outro ponto a ser analisado sobre o ELISA é sua característica monoparamétrica. A cada análise podemos pesquisar somente um tipo de anticorpo ou antígeno. Os pontos apresentados acima não são satisfatórios, pois além de ser muito

laborioso, o teste consome um tempo muito longo, características inadequadas para a análise da resposta imunológica de vacinas combinadas (BUTLER, 2000; VAZ, TAKEY & BUENO, 2012)

Para atender a esses objetivos é necessária uma técnica sensível, porém menos laboriosa e que apresente uma característica multiparamétrica, como por exemplo, a citometria de fluxo.

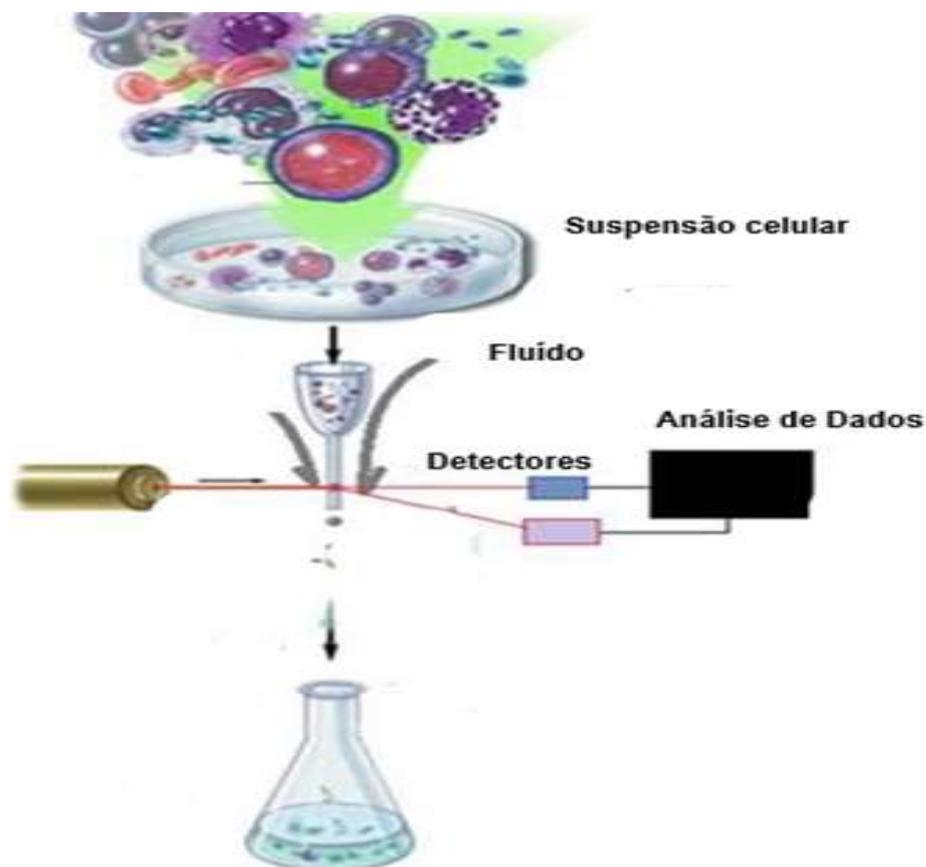
A citometria de fluxo pode ser definida como método, tecnologia e/ou ferramenta direcionada entre outras aplicações ao estudo de células e utilizada na identificação, avaliação, e diferenciação de diversas características celulares como conteúdo de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) modulação de receptores de superfície, atividade enzimática, produção de citocinas e de íons. Baseia-se na mensuração de parâmetros morfológicos e funcionais de células, por meio da detecção da dispersão da luz e fluorescência de substâncias (fluorocromos) (Centro de Conhecimento Aplicado – BD, 2017; BERTHO & FERRAZ, 2018).

O princípio básico da citometria resume-se no emprego de uma radiação laser direcionada, que excita substâncias fluorescentes (fluorocromos) presentes nas células, através das quais podemos interpolar informações biológicas, moleculares e/ou químicas das células em suspensão. Estas células marcadas são então transportadas e protegidas por um fluxo hidrodinâmico contínuo (ex. solução salina), que acomoda as mesmas, de forma que individualmente sejam interceptadas pelo *laser*. Ao ser excitado pela radiação do *laser*, o fluorocromo emite luz, que dependendo do comprimento de onda, possui uma cor característica. Os sistemas óticos (espelhos) e eletrônicos, coletam, filtram e convertem em pulsos elétricos os parâmetros de dispersão de luz e fluorescência emitidos. A aquisição destes parâmetros se dá através de um sistema computacional específico, permitindo ainda que o usuário interaja com a máquina e controle as funções da mesma. A seguir, os pulsos elétricos são convertidos em dados digitais ou analógicos, enviados a um computador e avaliados em *software* específico capaz de reproduzir através de gráficos mono e biparamétricos, informações físicas, químicas e biológicas de cada célula, em função da intensidade de fluorescência e da luz dispersada (CARVALHO *et al*, 2013) (Figura 9).

Alguns fatores tornam a citometria de fluxo uma tecnologia poderosa para as ciências biológicas, tais como, a aquisição multiparamétrica, com análise de dados multivariados, rapidez de processamento em comparação a outras tecnologias, baixo volume de amostra necessário para a realização da técnica, capacidade de análise de

um grande número de células e a separação ou *sorting* de células (SALES, MORAES-VASCONCELOS & DUARTE, 2013).

Apesar das grandes vantagens da técnica no laboratório clínico e/ou na pesquisa científica, existem algumas limitações, que podem ser interpretadas como desvantagens, como por exemplo, a impossibilidade de observação *in situ*, uma vez que as células são desagregadas do tecido de origem e o curto período de viabilidade celular (SALES, MORAES-VASCONCELOS & DUARTE, 2013).



**Figura 9** – Esquema representativo da citometria de fluxo. Análise de amostra em suspensão e aquisição de dados.

Uma das primeiras áreas a se beneficiar das aplicações clínicas da citometria de fluxo foi a hematologia. Algumas dessas aplicações são atualmente utilizadas regularmente para diagnóstico e monitoramento terapêutico (SALES, MORAES-VASCONCELOS & DUARTE, 2013). Podemos citar também a imunologia, na detecção ou identificação de células implicadas na imunidade celular, e contribui para a compreensão da fisiopatologia de fenômenos autoimunes, imunodeficiências e hipersensibilidade. Na microbiologia e na biotecnologia, auxilia na detecção de novos

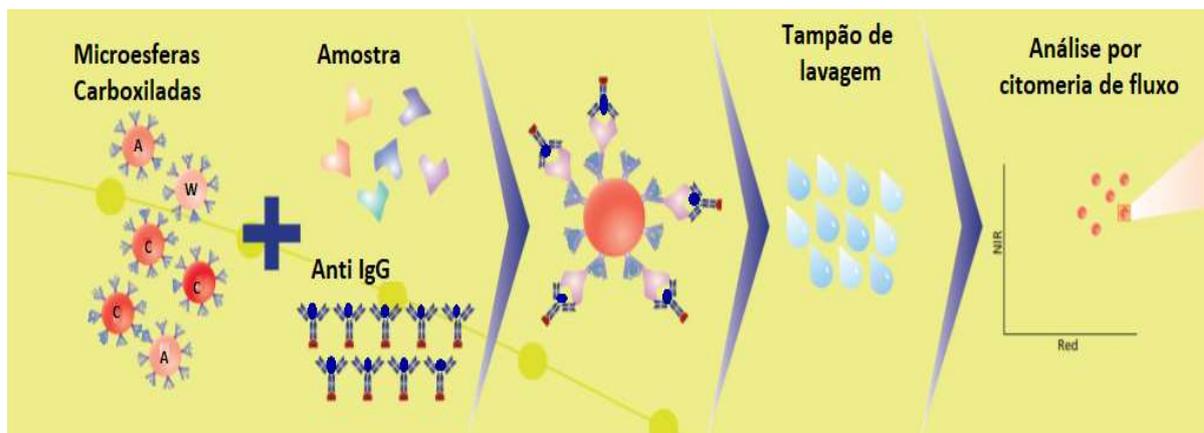
micro-organismos (Taxonomia e Sistemática), na detecção de novos vírus, nos estudos de dinâmica populacional de fitoplânctons, na contagem de células e estudos de viabilidade no monitoramento do crescimento de micro-organismos, nos estudos toxicológicos, na detecção e identificação de contaminantes alimentares, no monitoramento da fermentação e viabilidade celular de fungos. Outras áreas onde a citometria de fluxo é igualmente importante são o melhoramento animal e agropecuário e os estudos de biodiversidade, biotecnologia e melhoramento vegetal (SALES, MORAES-VASCONCELOS & DUARTE, 2013)

Na imunofenotipagem, os anticorpos marcados com fluorocromos se ligam a receptores na superfície celular e sua presença nas células é normalmente definida em termos qualitativos e quantitativos, utilizando como controle uma população celular não marcada, ou marcada com anticorpos não reativos a nenhum antígeno da célula estudada, porém do mesmo isotipo e conjugadas com o mesmo fluorocromo, denominados controles isotípicos. Nas últimas décadas, foi reconhecido que, pelo fato da intensidade do sinal fluorescente ser proporcional à quantidade de anticorpo ligado por célula, poderia ser relacionada ao número de antígenos expressos na superfície celular ou em fluidos biológicos. Essa relação faz dos citômetros de fluxo, teoricamente, instrumentos capazes de quantificar a expressão do antígeno em termos de molécula por célula ou em um determinado fluido. Quanto a sua característica quantitativa (QFC - *quantitative flow cytometry*), foi definida como a quantificação calibrada da intensidade de fluorescência das partículas (células ou microesferas) marcadas, com objetivo de determinar o número de ligantes fluorescentes (fluorocromos ou proteínas conjugadas a fluorocromos) marcando cada partícula. Vários métodos para calibração quantitativa de fluorescência foram desenvolvidos para quantificação da expressão de receptores através da quantificação do número de anticorpo monoclonal fluorescente ligado por célula (RIGATO & BRITO, 2013).

Após consenso da citometria de fluxo quantitativa em 1998, foi estabelecido que o sinal da fluorescência deve ser quantificado pelas moléculas de fluorocromos solúveis (MESF – *molecules of equivalent soluble fluorochrome*). A quantificação da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo revela o número de moléculas de anticorpo monoclonal ligadas à célula, portanto a intensidade de fluorescência de um anticorpo marcado se correlaciona com a quantidade de receptores nas células. Assim, o número de receptores nas células das amostras em análise pode ser estimado pela comparação com uma curva de amostras com concentração conhecida, marcadas

com reagentes controle e testadas em paralelo (RIGATO & BRITO, 2013).

O número de parâmetros que podem ser analisados simultaneamente tem aumentado a cada ano. A utilização de microesferas incorporadas com fluorocromos em diferentes proporções, tem possibilitado a análise de uma gama de parâmetros, tornando a tecnologia multiparamétrica uma ferramenta importante, tanto no diagnóstico clínico, como na pesquisa laboratorial. Quando a amostra é incubada com as microesferas, cada analito se ligará ao seu anticorpo específico, incorporado a respectiva microesfera. A seguir, são adicionados anticorpos secundários, marcados com fluorescência diferente da usada nas microesferas, que se ligarão aos analitos. Quanto maior a concentração do analito, maior a marcação de um anticorpo secundário e, conseqüentemente o deslocamento do grupo de microesferas no histograma (Figura 10). Após a aquisição dos eventos pelo aparelho, a quantificação de cada analito é realizada pela interpolação da intensidade fluorescência média (IFM) de seus anticorpos secundários aos valores da IFM da curva padrão (RIGATO & BRITO, 2013).



**Figura 10** – Esquema da análise utilizando microesferas carboxiladas, marcadas com fluorocromos em intensidades diferentes, para cada antígeno (adaptado do *site* BD Biosciences)

### 3 – JUSTIFICATIVA

Consolidar uma plataforma de conjugação de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W, onde a avaliação da resposta imunológica induzida a esses polissacarídeos conjugados e combinados foram pesquisados em um único teste proposto pela tecnologia multiparamétrica por citometria de fluxo, em substituição a metodologia padrão, o ELISA, que é um teste laborioso, com características monoparamétricas e demanda um longo tempo de execução.

## 4 – OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estabelecer um ensaio multiparamétrico, por citometria de fluxo, de rápida execução, menos laborioso e com baixa variabilidade, para a avaliação imunológica de vacinas conjugadas e combinadas utilizando microesferas carboxiladas.

### 4.1 – Objetivos específicos

Avaliar os títulos de IgG total dos camundongos imunizados com a vacina Menveo® pelo ELISA.

Padronizar ensaios multiparamétricos por citometria de fluxo (ensaio alternativo).

Utilizar a tecnologia multiparamétrica para avaliar os níveis de IgG total, na amostra sanguínea de camundongos imunizados, induzidos pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W presentes na vacina Menveo®.

Comparar os resultados obtidos pelo ELISA e pelo ensaio alternativo proposto.

Avaliar a sensibilidade de cada método bem como a correlação da metodologia alternativa com o ELISA.

## 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 - Imunização e coleta de sangue dos camundongos

Um grupo de cinquenta camundongos suíços (12 a 17 g), ambos os sexos, divididos em dez caixas contendo cinco animais cada (Figura 11), foram imunizados por via intramuscular com 0,2 mL da Vacina meningocócica tetravalente ACWY conjugada a CRM<sub>197</sub> (Menveo® Novartis) na concentração de 1/10 da dose humana, de acordo com a literatura (SILVEIRA *et al*, 2007). Foi utilizado um esquema de imunização de três doses com um intervalo de 15 dias entre as imunizações. Os animais em grupos de cinco foram sangrados pelo plexo retro-orbital sob a ação do colírio anestésico (Anestalcon) nos tempos zero (antes da primeira imunização), antes de cada dose e 15 dias após a terceira dose (Figura 12). Os tubos com gel separador (VACUETTE) contendo sangue foram submetidos à centrifugação a 1008 xg por dez minutos para a obtenção dos soros. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em

microtubos e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização. As amostras sanguíneas foram coletadas na forma de pool de cinco animais, totalizando um quantitativo de dez amostras (Figura 12).

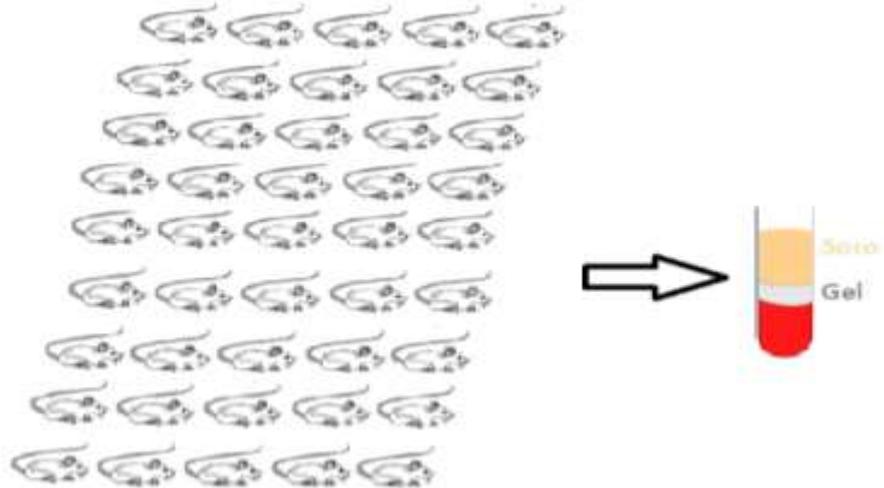


Figura 11 – Coletas sanguíneas feita em pools de cinco animais e posteriormente colocados em tubos com gel separador.

O protocolo experimental foi realizado de acordo ao Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz para experimentação animal (nº LW-65/14).

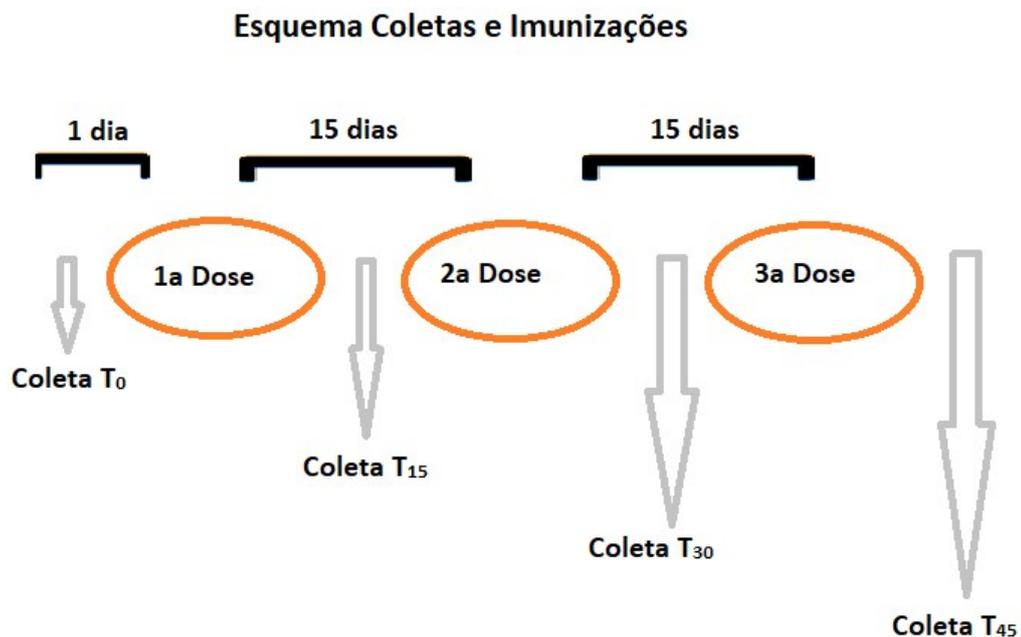


Figura 12 – Esquema de coletas e imunizações dos cinquenta camundongos suíços de ambos os sexos, divididos em dez caixas contendo cinco animais, no esquema vacinal de três doses com intervalos de quinze dias. A primeira coleta (T<sub>0</sub>) foi feita um dia antes da primeira dose da vacina, os tempos de coleta T<sub>15</sub> e T<sub>30</sub> foram obtidos antes da segunda e terceira dose respectivamente e, a coleta T<sub>45</sub>, quinze dias após a terceira dose da vacina.

## 5.2 – Detecção dos níveis de IgG total induzidos por polissacarídeos A, C e W de *Neisseria meningitidis* pelo ELISA

Para detecção dos níveis de IgG total induzidos pelos polissacarídeos A, C e W de *Neisseria meningitidis* foi utilizado o método imunoenzimático ELISA seguindo a instrução de trabalho (IT N° 3013) do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas Bacterianas do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) – FIOCRUZ (Figura 8), onde placas de poliestireno (Imm lux HB / Dynex Ref:1010 - placa com afinidade por complexos hidrofílicos e proteínas) foram revestidas com uma solução de polissacarídeo de interesse (A (Lote 02/01 PSA nativo), C (Lote 125EMPCP07) ou W (Lote 17/2016) a 10 µg/mL) em PBS 0,01M e conjugados a uma solução de Albumina Metilada humana (mHSA) (Lote 04/142 NIBISC-UK)(10µg/mL) (em PBS 0,01M, com a finalidade de obter uma concentração final de 5 µg/mL do conjugado formado (FRASCH *et al*, 1995; SILVEIRA *et al*, 2007). Foram distribuídos 100 µL / poço e as placas foram incubadas a temperatura de 4-8 °C *overnight* (aproximadamente 16 horas) em câmara úmida. Entre as etapas subsequentes foram realizados ciclos de lavagem nas placas com Tampão TBS pH7,5 em lavadora automática (AquaMax Plate Wash 2000 – Molecular Devices) com 200 µL / poço. Após lavagem, as placas foram bloqueadas com 200 µL / poço do tampão TBS pH7,5 + 5% soro fetal bovino (SFB) e mantidas em câmara úmida pelo período de uma hora a temperatura ambiente. As amostras e o soro padrão foram preparados em tampão de diluição (TBS pH7,5 + 5% SFB) e foram aplicados 200 µL / poço em duplicata e posteriormente realizadas as diluições seriadas (fator de diluição 1:2) resultando num volume final de 100 µL / poço. As placas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a temperatura de 4°C. No dia consecutivo à aplicação das amostras foi adicionado 100 µL/poço do anticorpo anti-IgG murino (*Whole Molecule*) conjugado a enzima fosfatase alcalina (Ref: A3688 Sigma-Aldrich) preparada em tampão de diluição (PSA 1: 35000; PSW 1:6000; PSC 1:30000) e as placas incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Ao final desta etapa, foi adicionado 100 µL/poço de solução de tampão do substrato e p-nitrofenil fosfatase (Ref: P7998 Sigma-Aldrich), ao abrigo da luz, a temperatura ambiente por 30 minutos e as placas foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da densidade ótica (DO) (Figura 13) no comprimento de onda a 405nm (Versa max tunable – Molecular Devices). As concentrações (UA/mL) foram obtidas pelo parâmetro logístico-4, programa SoftMaxPro versão 5, a partir dos soros padrão *in house* de camundongos

suíços imunizados com polissacarídeos dos grupos A (Lote 02/01 PSA nativo) e W (Lote 17/2016) de *Neisseria meningitidis* conjugados a proteína monomérica tetânica (PMT) (Lote 16PMT001ZRA), titulados arbitrariamente em 1000 UA/mL (WATSON *et al* , 2014; KINLOCK *et al*, 2018) e soro padrão *in house* de camundongos suíços, imunizados com a vacina Meningocócica C conjugada produzida em Bio-Manguinhos (Lote:138EXVMC03, com diluente Lote:138EXDMC03), com o título arbitrário de 808,524 UA/mL (Lote 31/08/2017).

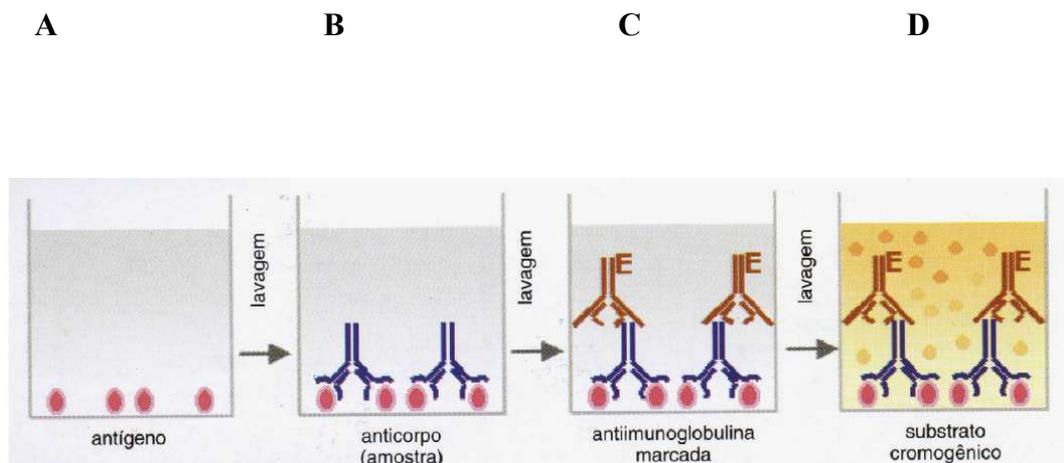


Figura 13 – Esquema das etapas do ELISA. (A) Placa sensibilizada com o polissacarídeo de interesse conjugado a mHSA. (B) Incubação das amostras de soro dos camundongos suíços imunizados. (C) Incubação com o anti-IgG murinho conjugado à fosfatase alcalina. (D) Reação enzimática na presença do substrato cromogênico (p-nitrofenil fosfatase). Entre as etapas do ensaio foram feitas lavagens com o tampão TBS pH 7,5 + 5% SFB (Adaptado GOLDSBY, KINDT & OSBORNE, 2002)

### 5.3 - Padronização do teste de acoplamento de polissacarídeos nas microesferas carboxiladas fluorescentes

#### 5.3.1 – Concentração de polissacarídeo A, C e W de *Neisseria meningitidis* imobilizados nas microesferas

As microesferas carboxiladas (QuantumPlex™ Carboxyl, 5,5µm de diâmetro, 5 grupos com intensidades diferentes do fluorocromo *Starfire Red*, Ref 238, Bangs Laboratories, Inc.) foram contadas em câmara de Neubauer ( $10^7$  microesferas/ teste) e lavadas duas vezes com tampão de lavagem (0,01M PB + 2% BSA) (16000 g por cinco minutos em centrífuga 5418R Eppendorf).

Após as etapas de lavagem, as microesferas foram ressuspendidas em 80  $\mu\text{L}$  de tampão de ativação (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  pH 6,2) e acrescidas de 10  $\mu\text{L}$  de 1-ethyl-3-[3dimethylaminopropyl] carbodiimide hidrócloride (EDC – THERMO) 50 mg/mL e 10  $\mu\text{L}$  de N-hidroxysulfosuccimide (Sulfo-NHS – THERMO) 50 mg/mL. A suspensão foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As microesferas foram lavadas com 250  $\mu\text{L}$  de tampão de acoplamento (MES – 0,05 M MES pH 5,0 em PW (do inglês *Pure Water* – água pura)) (Figura 14).

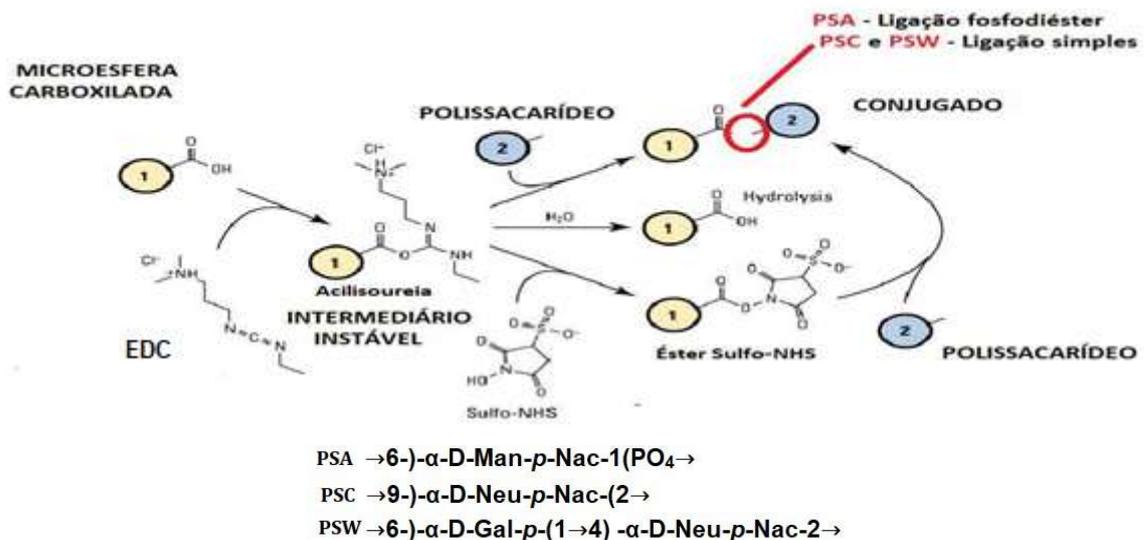


Figura 14 - Reação de conjugação – Adaptado (HERMANSON,2008)

As concentrações de antígenos foram adicionadas à  $10^7$  microesferas num volume final de 500  $\mu\text{L}$  de tampão de acoplamento (0,05M MES pH 7,2 – 8,5). A mistura foi incubada por 2 horas e 30 minutos em agitação de 200 rpm (agitador IKA-KS 260 basic), a temperatura ambiente. As microesferas foram lavadas 2 vezes com 1 mL de tampão de lavagem e bloqueadas 1h a temperatura ambiente com tampão de bloqueio (0,01M PB + 2% BSA) com agitação. Após a última lavagem as microesferas sensibilizadas foram estocadas em 300 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem (2 – 8 °C protegido da luz).

Baseados em protocolos da literatura (LAL *et al*, 2005; BORROW *et al*, 2006) foram testadas 4 concentrações de polissacarídeos A, C e W de *Neisseria meningitidis* para a sensibilização das microesferas.

Para avaliar o percentual de polissacarídeo adsorvido à microesfera foi realizada a quantificação de polissacarídeo livre, proveniente da reação, nos sobrenadantes resultantes das etapas de lavagem. Para os polissacarídeos C e W, foi realizada a dosagem de ácido siálico

(SVERNINHOLN, 1957) e para o polissacarídeo A foi utilizado o método Chen, para a quantificação de fósforo (P) (CHEN *et al*, 1956).

### **5.3.2 – Avaliação do acoplamento do PSA, PSC e PSW com a microesfera carboxilada pela mimetização com Ácido Gálico**

Para monitorarmos o percentual de ligação entre as microesferas carboxiladas e o polissacarídeo, foram mimetizadas as reações de conjugação utilizando o ácido gálico, para reprodução das estruturas funcionais das microesferas, com o PSC e PSW, representado pelo ácido siálico (NANA), e o Inositol para o PSA. Antes de verificar as amostras obtidas, cada reagente envolvido na reação de conjugação foi injetado na coluna cromatográfica para verificar seu tempo específico de retenção (Curva Padrão). A cinética de reação foi acompanhada no período de 15 minutos a 2,5 horas para determinar o melhor tempo de conjugação. As estabilidades químicas dos bioconjugados de ácido gálico e ácido siálico, e, ácido gálico e Inositol, foram estudadas seguindo os tempos de retenção e suas respectivas áreas relativas.

Para mimetizar a reação de acoplamento dos polissacarídeos A, C e W foi utilizado 10 mg de ácido gálico, representando a estrutura das microesferas carboxiladas. Foi adicionado ao sistema as soluções de EDC (10 mg / 50 mL) e Sulfo-NHS (10 mg / 50 mL), onde posteriormente foi incubado durante 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Após o tempo de incubação, foi acrescentado 10 µg de NANA (ácido siálico), representando os polissacarídeos dos grupos C e W e em outra reação similar, representando o polissacarídeo A, 10 µg de Inositol.

A amostra foi alíquotada e analisada de acordo com o tempo de incubação em sistema cromatográfico (Waters 2690 – Separations Module):

- T15 (após 15 minutos do início da reação de acoplamento),
- T30 (após 30 minutos do início da reação de acoplamento),
- T60 (após 60 minutos do início da reação de acoplamento),
- T90 (após 90 minutos do início da reação de acoplamento),
- T120 (após 120 minutos do início da reação de acoplamento),
- T150 (após 150 minutos do início da reação de acoplamento).

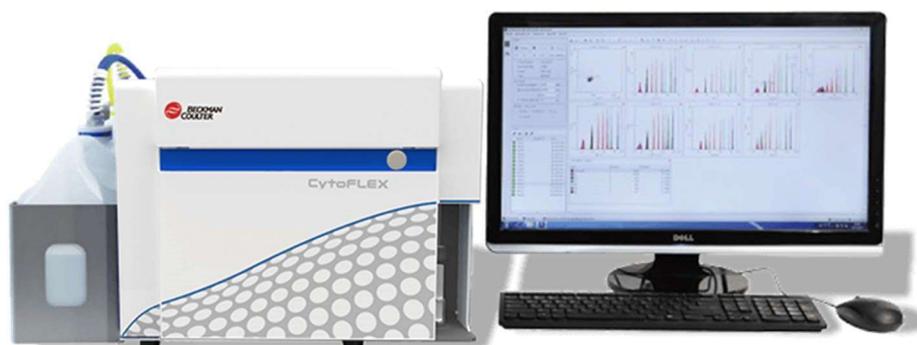
#### 5.4 - Detecção e quantificação dos anticorpos induzidos pelos polissacarídeos dos grupos A, C e W de *Neisseria meningitidis* combinados na vacina Menveo® pela tecnologia multiparamétrica baseada em microesferas.

A concentração das microesferas foi ajustada para  $10^5$  por reação e foram incubadas com 100  $\mu$ L do soro dos camundongos e o soro padrão (1:1) uma hora a temperatura ambiente. Foram realizadas duas lavagens com 500  $\mu$ L de tampão de diluição (PBS 2% SFB + 0,1% Azida sódica) (cinco minutos a 16000 xg). O precipitado foi incubado por 30 minutos a 37°C em agitação (200 rpm) com anticorpo anti IgG de camundongo conjugado a FITC (Ref: F0257 SIGMA-ALDRICH). Foram realizadas duas lavagens com 500  $\mu$ L de tampão de lavagem, e as amostras foram ressuspensas com 200  $\mu$ L do mesmo tampão e armazenadas a temperatura de 2 – 8°C, protegido da luz até a análise no citômetro de fluxo.

#### 5.5 – Controle de qualidade da citometria de fluxo

A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter) utilizando o programa CytExpert 2.1 (Beckman Coulter) (Figura 15). Para cada amostra foram adquiridos 5.000 eventos no *gate* de microesferas. A identificação das microesferas foi realizada através de um *dot plot* de tamanho *versus* fluorescência de *Starfire Red*, fluorocromo marcador das microesferas.

A avaliação da resposta das amostras foi realizada pela marcação com anticorpo anti-IgG murino conjugado a FITC. A emissão do *Starfire Red* foi quantificada no filtro (690 / 50 BP) e a emissão do FITC no filtro (525 / 40 BP).



**Figura 15** – Citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter)

Para calibração do equipamento, antes da aquisição das amostras, foi realizado o processo de controle de qualidade diário do citômetro de fluxo através da aquisição de microesferas de calibração comercial, conforme indicação do fabricante do equipamento (CytoFLEX Daily QC Fluorospheres, Beckman Coulter).

Para a padronização dos ensaios, os ganhos dos parâmetros analisados foram uniformizados através das microesferas utilizadas no presente estudo visando determinar o posicionamento adequado de cada intensidade de fluorescência no gráfico. O ganho para a intensidade de fluorescência das microesferas foi escolhido de modo que o pico dos controles negativos (microesferas sem soro antes e depois do acoplamento com o anti-IgG murino conjugado ao FITC (Ref: F0257 SIGMA-ALDRICH) ficasse entre  $10^2$  e  $10^3$  no histograma de fluorescência. Este ganho foi mantido para os três grupos de microesferas utilizadas no estudo.

A análise dos dados adquiridos no CytoFLEX foi realizada utilizando o *software* FlowJo (Tree Star versão 10.2). Os resultados foram expressos em percentual de microesferas positivas e intensidade média de fluorescência para FITC.

## 5.6 – Cálculo do *Cutoff* do ELISA e da citometria de fluxo

O *Cutoff* (ponto de corte) foi calculado, de forma que, seu resultado fosse a média de quatro amostras do controle negativo acrescidas de duas vezes o desvio padrão dos controles negativos (HELMBERG,1997), assim seria possível determinar um limiar de concentração para IgG total nos soros e comparar com o ELISA (LAHER *et al*, 2006).

$$\text{Cutoff} = \bar{X} 4 \text{ CN} + 2 . \text{SDCN}$$

*Sendo:*

$\bar{X}$  = Média Aritmética

CN = Controle Negativo

SDCN = Desvio Padrão dos controles negativos

## 5.7 - Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de Grubbs (Excell) para a retirada dos valores discrepantes, isto é, observações que apresentam um grande afastamento das

demais da série, ou que são inconsistentes.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa Prism GraphPad<sup>®</sup> versão 6.01 e o nível de significância estatística foi determinado para  $p < 0,05$ . Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. A significância das diferenças entre as várias concentrações de antígenos utilizados na sensibilização das microesferas foi avaliada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A correlação entre o ELISA e a metodologia proposta foi realizada pelo teste de correlação de Spearman ( $r$ ) e a determinação do nível de correlação seguiu a classificação de Lira (2004). Um  $p$ -valor  $< 0,05$  significa que o acaso não é suficiente para explicar os resultados. O nível de correlação varia entre:  $r_s < 0,2$  (negligenciável);  $0,2 \leq r_s < 0,4$  (fraca);  $0,4 \leq r_s < 0,6$  (moderada);  $0,6 \leq r_s < 0,8$  (forte); e  $r_s \geq 0,8$  (muito forte). A avaliação da diferença estatística entre o ELISA e a Citometria de Fluxo foi determinada pelo teste de Mann-Whitney.

## 6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 - Detecção dos níveis de IgG total para os polissacarídeos A, C e W de *Neisseria meningitidis* pelo teste de ELISA

Em estudos pré-clínicos e clínicos de vacinas, o monitoramento da imunidade induzida é essencial. Além de fornecer uma média na administração de vacinas nos indivíduos, os biomarcadores imunológicos que mudam com as intervenções da vacina podem ser candidatos a correlatos de proteção, ou podem ajudar a direcionar a busca por correlatos confiáveis nos mecanismos imunológicos relevantes. Existem vários ensaios que permitem a detecção de biomarcadores imunológicos em material derivado de sangue, como o ELISPOT, ELISA dentre outros. (SMITH *et al*, 2015).

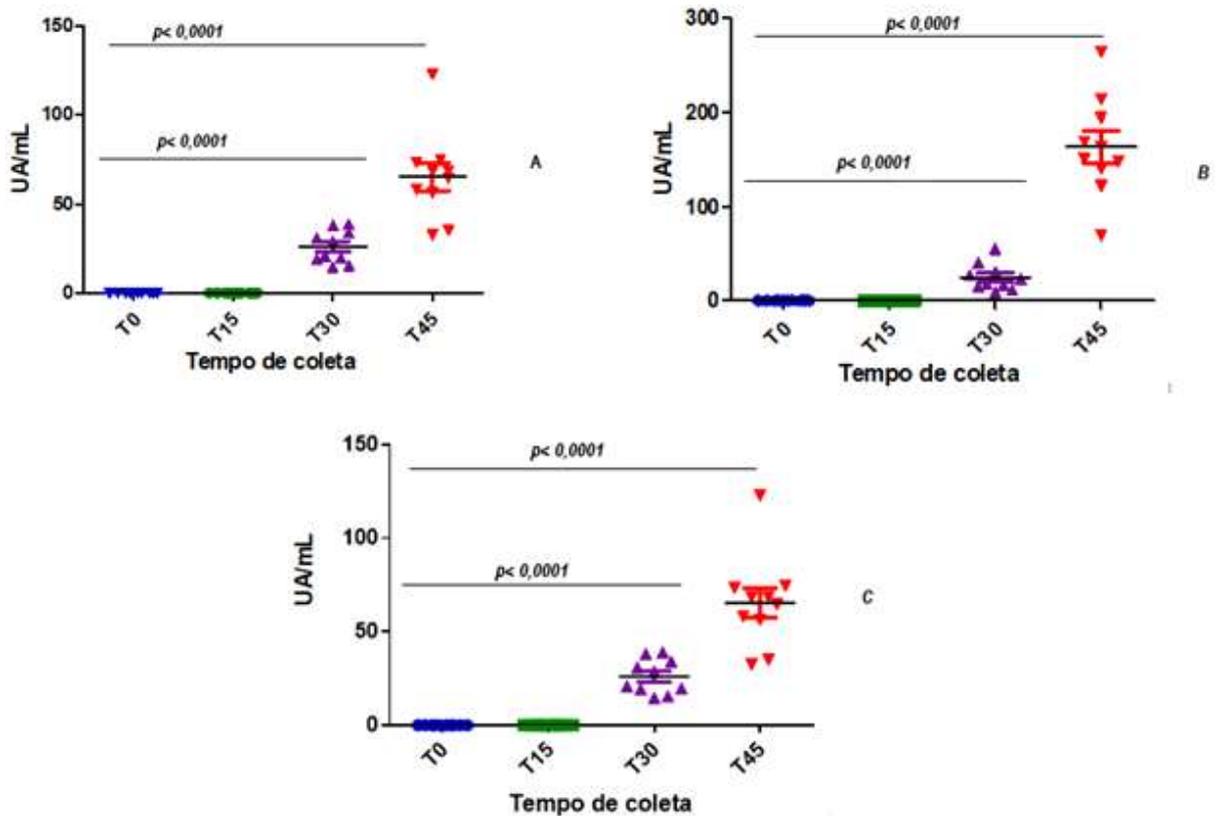
Apesar da importância dos anticorpos bactericidas e o seu monitoramento para a avaliação da resposta imunológica no desenvolvimento de vacinas meningocócicas, o ELISA é muito utilizado nos estudos pré-clínicos e clínicos na avaliação da potência e da estabilidade destas vacinas (SILVEIRA *et al*, 2007; JESSOUROUN *et al*, 2005).

A avaliação da imunogenicidade, a três dos antígenos presentes na vacina tetravalente Menveo<sup>®</sup> (polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W) foi realizada pela determinação dos títulos de IgG total por ELISA.

Os soros de camundongos imunizados no esquema de três doses foram analisados em pools de cinco animais, ao longo da cinética de coletas de amostras (T0, T15, T30 e T45). Títulos considerados como positivos, baseados nos *Cutoff* calculados, foram detectados a partir da 2ª imunização (T30), com um aumento estatisticamente significativo, quando comparado aos títulos pré-ímmes ( $p < 0,0001$ ), para os três polissacarídeos analisados, atingindo um pico de produção de anticorpos 15 dias após a última imunização (T45). Quinze dias após a 3ª imunização (T45), podemos observar um título médio mais elevado contra o PSA, seguido por PSC e PSW (Figura 16).

Esses resultados já foram observados anteriormente pelo grupo (GABRIEL, 2017; SILVEIRA *et al*, 2007), onde camundongos suíços imunizados com a Vacina Meningocócica C Conjugada (MenCBio), desenvolvida em Bio-Manguinhos, num esquema de três doses apresentou títulos de IgG detectáveis a partir da 2ª dose da vacina, alcançando um pico após a 3ª dose (2083,7 UA/mL) quando comparado ao T0.

Entretanto a média de concentração de IgG total, induzida pelo PSC conjugado da Menveo®, detectada no presente trabalho, é mais baixa do que a induzida pela MenCBio devido a proteína carreadora utilizada na vacina comercial (CRM<sub>197</sub>) ser menos imunogênica do que a PMT (Proteína Monomérica Tetânica), carreadora do polissacarídeo na vacina MenCBio (DAGAN, POOLMAN & SIEGREST, 2010). As proteínas carreadoras são responsáveis pelo aprimoramento da resposta ao polissacarídeo ao envolver subpopulações celulares, distintas das habitualmente envolvidas em uma resposta a este tipo de molécula, como as células T auxiliares, produzindo citocinas e sinais de ativação e as células foliculares dendríticas (GABRIEL 2017; DAGAN, POOLMAN & SIEGREST, 2010). A PMT tem gerado uma produção maior de anticorpos contra o polissacarídeo devido a uma resposta de células B predominante (BRYNJOLFSSON *et al*, 2008).



**Figura 16** – Quantificação dos títulos de IgG total, contra os polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos C (A), A (B) e W (C), a partir do soro de camundongos imunizados com a vacina tetravalente conjugada Menveo® por ELISA. Foi observado um aumento significativo a partir do T30 (2ª dose), quando comparado a amostra pré-imune (T0) ( $p < 0,0001$ ). T0 (coleta pré-imune), T15 (15 dias após a 1ª imunização), T30 (15 dias após 2ª imunização) e T45 (15 dias após a 3ª imunização). (— mediana;  $\perp$  desvio padrão).

## 6.2 - Padronização da concentração de polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W para o acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na técnica de citometria de fluxo

A tecnologia multiparamétrica utiliza microesferas fluorescentes distintas como um suporte sólido para o antígeno, conseguindo incorporar todas as vantagens do ELISA, e também aumentar o rendimento da amostra, reduzindo significativamente o volume a ser analisado e o tempo do teste (LAHER et al, 2006).

Apesar da existência de vários protocolos de acoplamento de antígenos proteicos à microesferas carboxiladas, uma padronização do processo para um antígeno de natureza diferente é necessária, objetivando a melhoria, performance, atividade, estabilidade, dentre outros pontos. Como a atividade e a cinética de ligação são altamente dependentes da orientação da molécula imobilizada, grupos reativos que estão disponíveis para o

acoplamento ou modificação devem ser cuidadosamente considerados (LAL *et al*, 2003; MOROZOV & MOROZOVA, 2006; FERBAS *et al*, 2007; PERRAUT *et al*, 2014; ANDRADE *et al*, 2014; MORTBERG *et al*, 2016).

A consistência do resultado em citometria de fluxo está diretamente relacionada ao anticorpo utilizado. Embora anticorpos policlonais possam ser utilizados, em geral se empregam anticorpos monoclonais na realização do ensaio. A especificidade do monoclonal está relacionada à proporção entre a quantidade do anticorpo e do antígeno para otimização da detecção. O tamanho do monoclonal também guarda importância com o resultado do experimento e está relacionado, por exemplo, à localização do antígeno (MOARES – VASCONCELOS & DUARTE, 2013).

A aplicação clínica dos ensaios multiparamétricos dependem da obtenção de resultados semelhantes a técnicas de rotina, principalmente o ELISA. Em contrapartida, Lal e colaboradores (2003) ao desenvolverem um teste multiparamétrico, para a pesquisa de anticorpos contra nove antígenos de *Streptococcus pneumoniae* observaram uma alta especificidade, com menos de 30% de interferência heteróloga entre os antígenos analisados (LAL *et al*, 2005).

Desde o início da década de 1980, a metodologia multiparamétrica tem se tornado mais popular para a análise do título de anticorpos em vacinas combinadas. Essa tecnologia tem permitido a realização de análises celulares e refinadas, com a utilização de até vinte parâmetros diferentes. (MOARES – VASCONCELOS & DUARTE, 2013). Além disso, a citometria de fluxo à base de microesferas é mais rápida do que o ELISA de fase sólida. A redução dos tempos de incubação e tempos totais do ensaio permitem que mais experimentos sejam realizados, dentro de um período reduzido de tempo (BÄRNES *et al*, 2015).

A concentração dos polissacarídeos utilizados na sensibilização das microesferas carboxiladas (QuantumPlex - Bangs Laboratories) foram padronizadas seguindo alguns parâmetros propostos para o ensaio, tais como: (1) melhor rendimento do teste citometria de fluxo; (2) menor coeficiente de variação entre as triplicatas do soro padrão; (3) alta correlação com o ELISA; (4) menor interferência na amostra negativa; (5) menor quantidade de polissacarídeo residual após o acoplamento e (6) estabilidade do acoplamento dos polissacarídeos às microesferas.

Cada polissacarídeo (A, C e W) foi acoplado a um grupo de microesferas de intensidades diferentes de um mesmo fluorocromo (Starfire Red), para determinar qualitativamente os níveis de IgG total para cada antígeno (Figura 17).

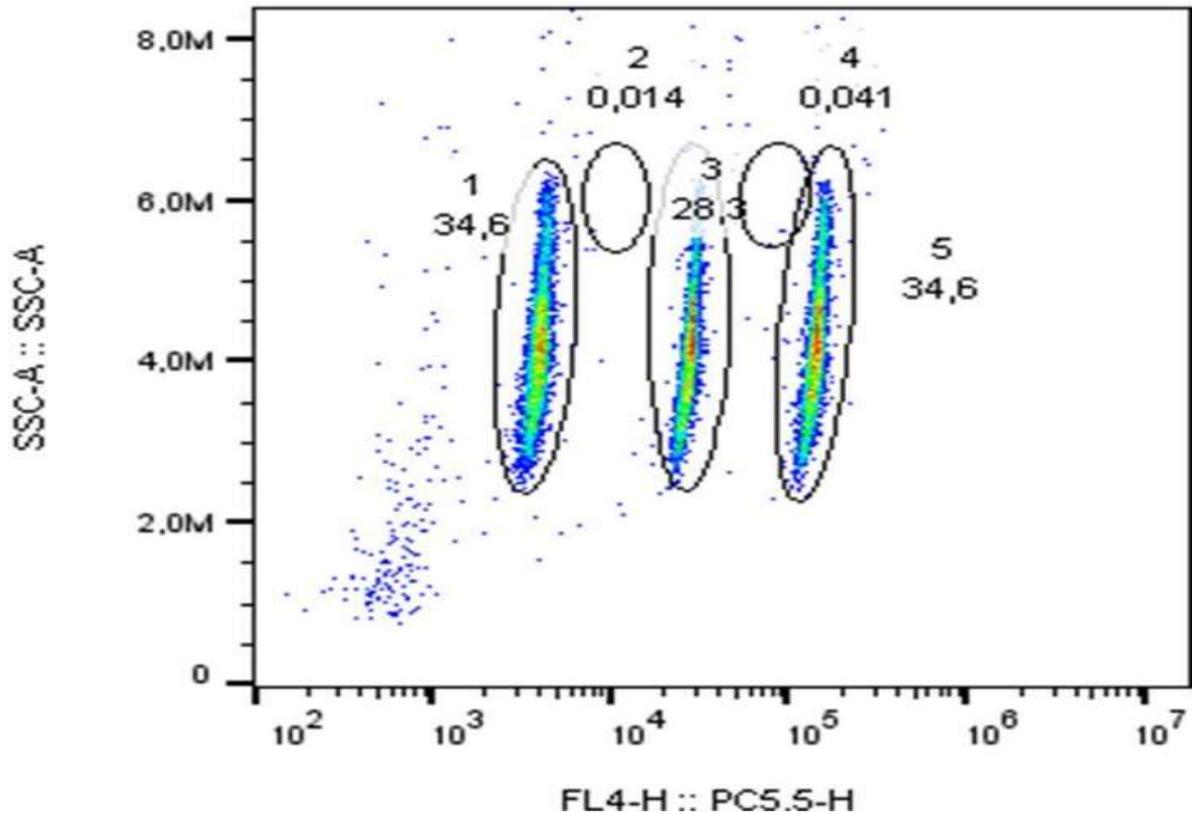


Figura 17 – Representação gráfica das microesferas carboxiladas com intensidades diferentes do fluorocromo *Starfire Red* (QuantumPlex – BangsLaboartories) – *SSC* (complexidade área de dispersão da luz) – eixo y; *FL4-H* (*Starfire Red*) - eixo x representa a posição do *gate* das populações de microesferas com diferentes intensidades.

A concentração de polissacarídeo utilizada para sensibilizar as microesferas, para a pesquisa dos títulos de IgG, foi determinada pela análise em triplicata das amostras de soros padrão *in house* para os três polissacarídeos, de uma amostra negativa e do branco (composto pelas microesferas sensibilizadas acrescido dos tampões de lavagem utilizados no experimento).

Baseada na literatura (LAL *et al*, 2005; BORROW *et al*, 2006), foram testadas 4 concentrações de cada polissacarídeo, como mostra a tabela (Tabela 3):

**Tabela 3** - A tabela mostra as concentrações de cada polissacarídeo (PSA, PSC e PSW) utilizada na sensibilização das microesferas. Cada concentração ([ ]mg/mL) foi analisada em triplicatas biológicas.

PSA	PSC	PSW
[ ]mg/mL	[ ]mg/mL	[ ]mg/mL
0,9	0,8	1
1,8	1,7	2
3,5	3,4	4
7	7	8

Foi determinado um valor para a amostra branco, a partir da média das repetições realizadas, que foi descontado de todas as amostras. A IFM (Intensidade de Fluorescência Média) da amostra branco foi de 354, 355 e 485, para o PSA, PSC e PSW respectivamente.

A concentração do PSC adequada para a sensibilização das microesferas foi de 1,7 mg/mL devido à ausência de diferença estatística significativa entre as triplicatas ( $p=0,8785$ ), além de apresentar a maior correlação com o ELISA utilizado na pesquisa de títulos IgG total induzidos pelo mesmo polissacarídeo ( $r=0,995015$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Representa a correlação das concentrações ( $r$ ) de PSC utilizadas na técnica de citometria de fluxo com o ELISA para PSC e a diferença estatística da avaliação das triplicatas do soro padrão para PSC frente as quatro concentrações do polissacarídeo.  $p$ -valor representa a diferença estatística entre as triplicatas realizadas.

[ ] PSC (mg/mL)	$r$	$p$
0,8	0,924915	0,045
1,7	0,995015	0,8785
3,4	0,907889	0,05
7	0,931561	0,023

O percentual de incorporação do PSC (1,7mg/mL) nas microesferas foi de 74%, como observamos pela dosagem de ácido siálico (SVERNHOLOM, 1957) no sobrenadante, mostrando um bom rendimento das condições utilizadas.

O rendimento da técnica de citometria de fluxo é mostrado no gráfico, onde apesar da concentração de 0,8 mg/mL apresentar uma IFM maior do que a concentração escolhida, a interferência no branco (540 IFM) comprometeu o resultado final bem como pela menor incorporação e correlação com o ELISA na pesquisa de anticorpos para o mesmo polissacarídeo (Figuras 18 e 19).

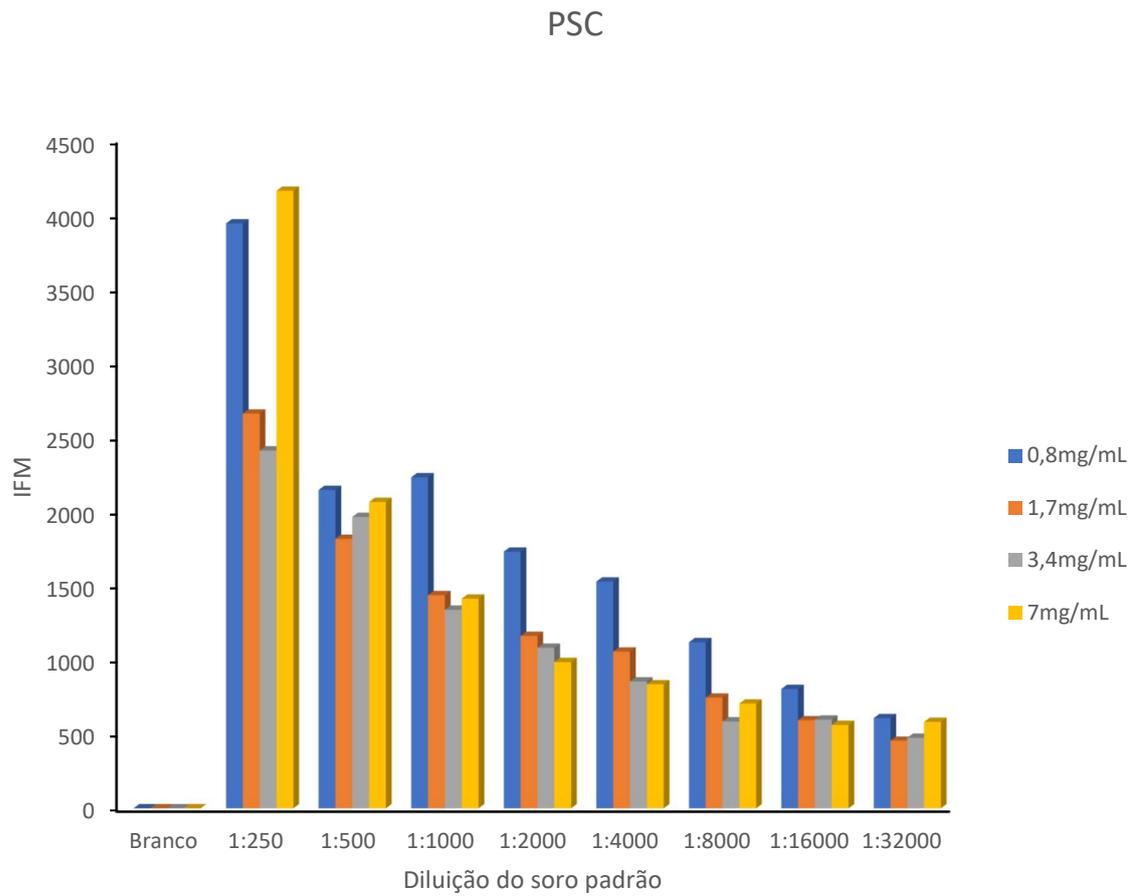
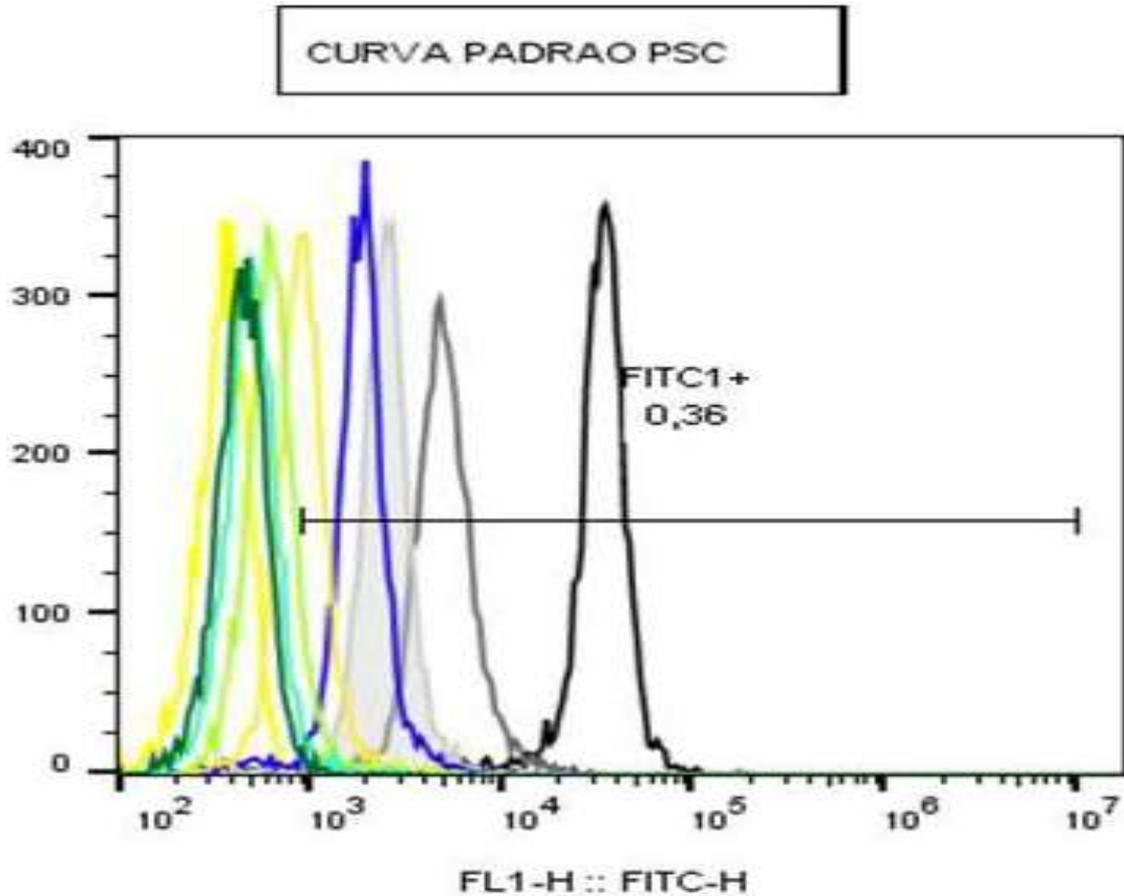


Figura 18 – Comparação das concentrações de PSC utilizado no acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na citometria de fluxo para a pesquisa dos títulos de IgG no soro padrão *in house* contra o PSC. O eixo do x representa as diluições utilizadas no teste e o eixo do y a intensidade de fluorescência média (IFM) obtida.



	AMOSTRAS	IFM
	Soro Padrão 1:32000	442
	Soro Padrão 1:16000	494
	Soro Padrão 1:8000	621
	Soro Padrão 1:4000	900
	Soro Padrão 1:2000	1842
	Soro Padrão 1:1000	2450
	Soro Padrão 1:500	4871
	Soro Padrão 1:250	32768
	Negativo	358

**Figura 19** - Histograma representativo dos títulos de IgG total do soro padrão murino para o polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* grupo C e do controle negativo (microesferas + conjugado). Cada pico representa uma diluição do soro padrão (1:250 – 1:32000) e o controle negativo (1:400) é representado pelo 1º pico. [ ] PSC incorporado na microesfera = 1,7mg/ML.

Para os demais polissacarídeos (PSA e PSW) foi utilizada a mesma abordagem na padronização do acoplamento dos antígenos às microesferas. Foi necessária uma concentração maior dos polissacarídeos para que os testes apresentassem melhores rendimentos.

Para o polissacarídeo A foram testadas quatro concentrações (0,9 mg/mL; 1,8mg/mL; 3,5 mg/mL, 7 mg/mL), onde verificou-se que a melhor concentração para a correlação entre o ELISA e a citometria de fluxo foi a de 7mg/mL, ( $r=0,988293$  e  $p = 0,7965$ ) (Tabela 5, Figura 20 e 21).

**Tabela 5** - Representa a correlação das concentrações de PSA utilizadas na técnica de citometria de fluxo com o ELISA para o mesmo polissacarídeo e a diferença estatística da avaliação das triplicatas do soro padrão para PSA frente as quatro concentrações do polissacarídeo. *p-valor* representa a diferença estatística entre as triplicatas realizadas

[ ] PSA (mg/mL)	<i>r</i>	<i>p</i>
0,9	0,965026	0,1879
1,8	0,979973	0,4242
3,5	0,965230	0,38
7	0,988293	0,7965

A dosagem de resíduos de PSA no sobrenadante, resultante das etapas de lavagem, foi realizada pelo método de Chen, pela quantificação de fósforo (P) na amostra (CHEN *et al*,1956). O percentual de incorporação de polissacarídeo foi de 89% (Figura 20).

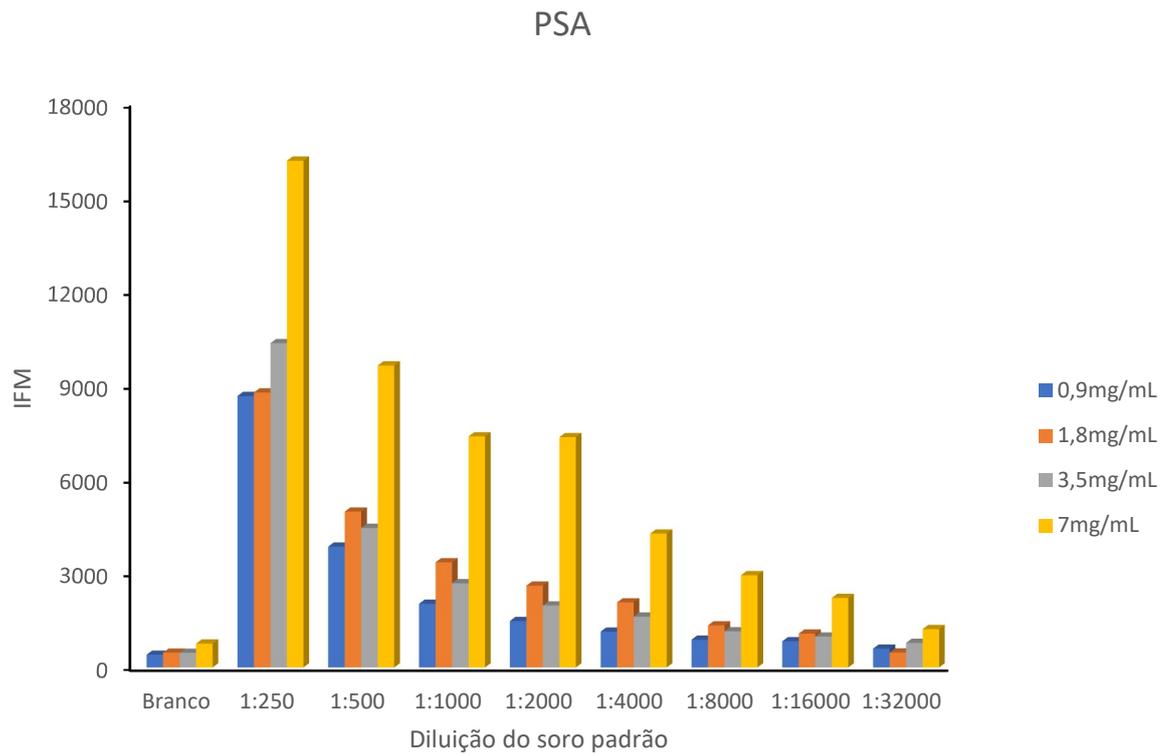
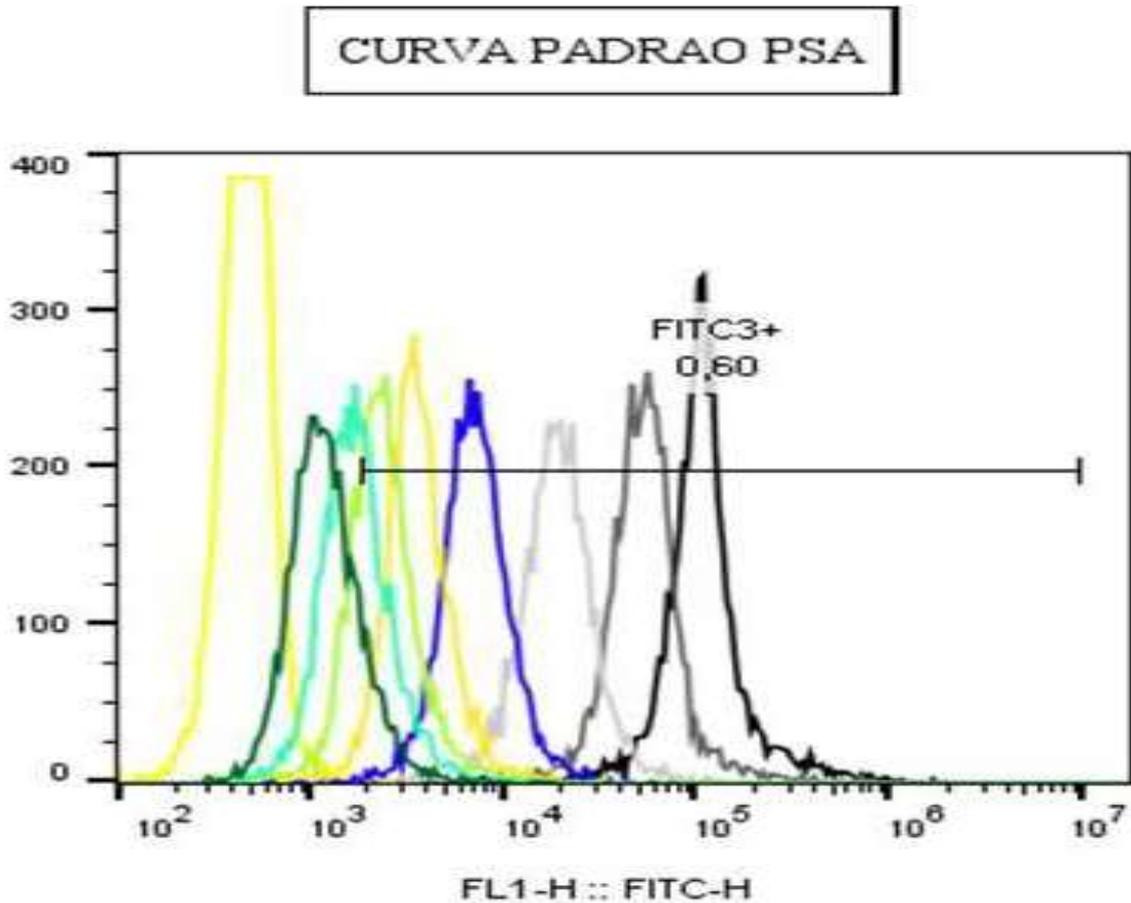


Figura 20 – Comparação das concentrações de PSA utilizadas no acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na citometria de fluxo para a pesquisa dos títulos de IgG no soro padrão *in house* contra o PSA. O eixo do x representa as diluições utilizadas no teste e o eixo do y a intensidade de fluorescência média obtida (IFM).



	AMOSTRAS	IFM
	Soro Padrão 1:32000	1155
	Soro Padrão 1:16000	1672
	Soro Padrão 1:8000	2276
	Soro Padrão 1:4000	3434
	Soro Padrão 1:2000	6929
	Soro Padrão 1:1000	18533
	Soro Padrão 1:500	51809
	Soro Padrão 1:250	102409
	Negativo	469

FIGURA 21: Histograma representativo dos títulos de IgG total do soro padrão murino para o polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* grupo A e do controle negativo. Cada pico representa uma diluição do soro padrão (1:250 – 1:32000) e o controle negativo (1:400) é representado pelo 1º pico. [ ] PSA incorporado na microesfera = 7 mg/mL

Para o PSW (Figura 22 e 23), dentre as concentrações utilizadas (1 mg/mL; 2 mg/mL; 4 mg/mL; 8 mg/mL) a que mostrou uma melhor correlação com a metodologia referência foi de 8 mg/mL ( $r = 0,997505$ ), com um percentual de acoplamento de 92% nas microesferas e ausência de diferença estatística entre as triplicatas de soro padrão utilizadas ( $p = 0,4712$ ) (Tabela 6).

Tabela 6 - Representa a correlação das concentrações ( $r$ ) de PSW utilizadas na citometria de fluxo e no ELISA e a diferença estatística da avaliação das triplicatas do soro padrão para PSW frente as quatro concentrações do polissacarídeo.  $p$ -valor representa a diferença estatística entre as triplicatas realizadas.

[ ] PSW (mg/mL)	$r$	$p$
1	0,996629	0,0092
2	0,975899	0,0856
4	0,991909	0,5011
8	0,997505	0,4712

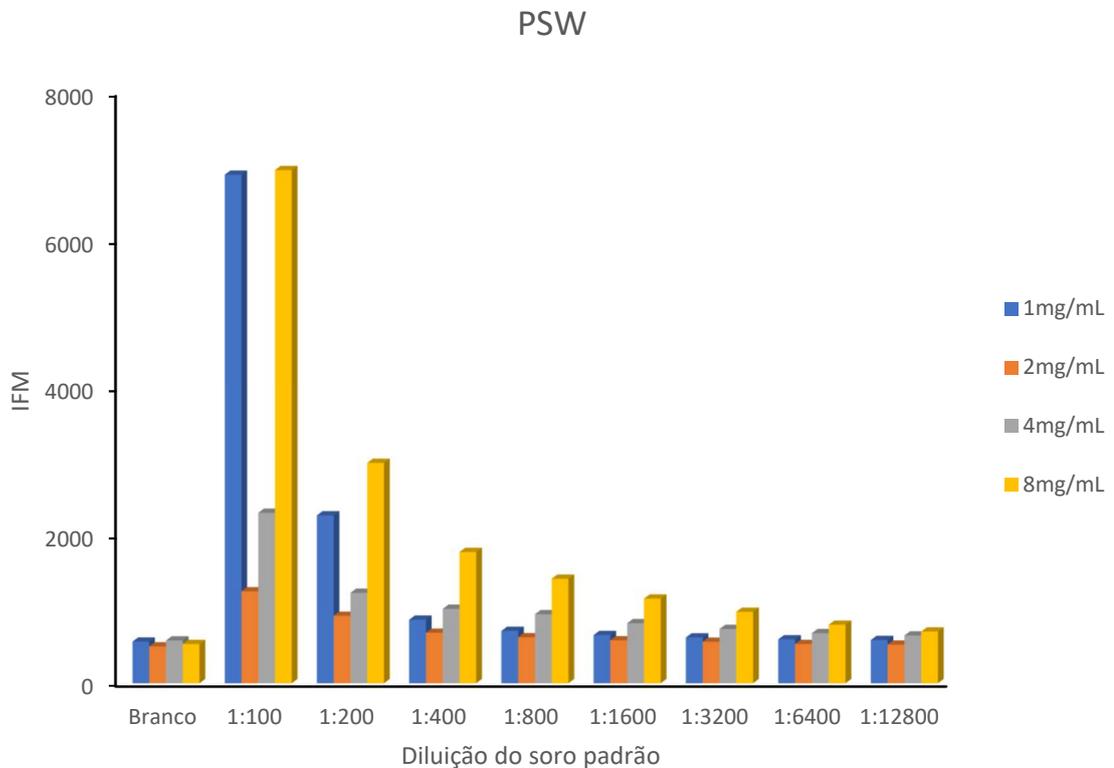
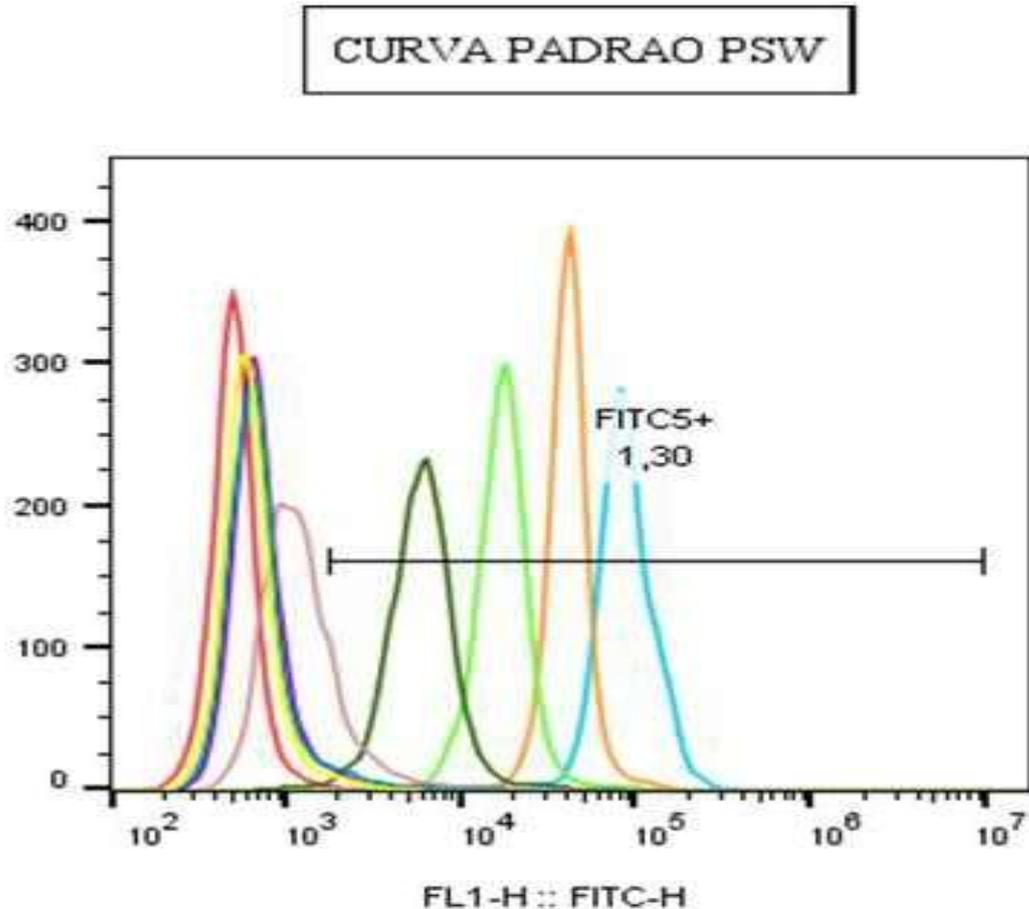


Figura 22 – Comparação das concentrações de PSW utilizado no acoplamento nas microesferas carboxiladas utilizadas na citometria de fluxo para a pesquisa dos títulos de IgG no soro padrão *in house* contra o PSW. O eixo do x representa as diluições utilizadas no teste e o eixo do y a intensidade de fluorescência média obtida (IFM)



	AMOSTRAS	IFM
<span style="color: yellow;">█</span>	Soro Padrão 1:12800	595
<span style="color: cyan;">█</span>	Soro Padrão 1:6400	651
<span style="color: purple;">█</span>	Soro Padrão 1:3200	671
<span style="color: pink;">█</span>	Soro Padrão 1:1600	1128
<span style="color: green;">█</span>	Soro Padrão 1:800	5878
<span style="color: lightgreen;">█</span>	Soro Padrão 1:400	16921
<span style="color: orange;">█</span>	Soro Padrão 1:200	39891
<span style="color: lightblue;">█</span>	Soro Padrão 1:100	82646
<span style="color: red;">█</span>	Negativo	502

FIGURA 23: Histograma representativo dos títulos de IgG total do soro padrão murino para o polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* grupo W e do controle negativo. Cada pico representa uma diluição do soro padrão (1:100 – 1:12800) e o controle negativo (1:400) é representado pelo 1º pico. [ ] PSW incorporado nas microesferas = 8 mg/mL

Outras etapas do método também foram avaliadas juntamente com a padronização das concentrações, tais como a temperatura e o tempo de incubação, fatores que foram importantes para o rendimento do ensaio proposto.

Foi realizada uma cinética de tempo de incubação, do polissacarídeo com a

microesfera, que variou de 30 minutos a 2,5 horas. O tempo de incubação de 2,5 horas, à temperatura ambiente, foi o mais adequado (Tabela 7 e 8), pois ocorreu um maior percentual de acoplamento dos três polissacarídeos nas microesferas, ao contrário de Lal e colaboradores, que observaram que um menor tempo de conjugação para o PSA foi requerido (1,5 horas), enquanto que para os demais PS foi de 2,5 horas.

Devido às semelhanças nas estruturas polissacarídicas capsulares bacterianas é esperado um baixo nível de reatividade cruzada entre os três grupos. (LAHER et al, 2006).

A estabilidade para lotes de microesferas incorporadas com polissacarídeo é um importante fator no processo de implementação deste novo método. Pavliakova e colaboradores (PAVLIAKOVA *et al*, 2018) monitoraram periodicamente microesferas sensibilizadas e observaram que a sensibilização se mantinha estável por aproximadamente dez meses utilizando o PS conjugado a Poli-L-Lisina (PLL). Bärnes e colaboradores (2018), sugerem o comprometimento dos epítomos de ligação do PS devido a conjugação com a Poli-L-lisina. Substituindo a Poli-L-Lisina utilizaram o DMTMM (4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinium chloride) como ponte de ligação do PS às microesferas carboxiladas obtendo um período de estabilidade da sensibilização de 12 meses. Com o objetivo de evitar tal problema e reduzir o coeficiente de variação (25%), observado no ELISA, promovemos uma ligação entre as microesferas carboxiladas e o PS, utilizando somente os agentes de acoplamento EDC e Sulfo-NHS e um aumento do pH do tampão de acoplamento para 8,6, favorecendo assim a ligação entre as duas estruturas. Com este procedimento obtivemos um período de estabilidade do acoplamento de cinco meses, com uma alta correlação com o método de referência. O EDC e Sulfo-NHS são considerados agentes de comprimento zero (*zero-length crosslinkers*) pois promovem ligações entre duas moléculas, sem formar composto adicional entre os dois sistemas (HERMANSON, 2008). Esse fato possibilita que os grupamentos químicos das duas moléculas sejam ligados covalentemente, sem a formação de um ligante adicional ou espaçamento. Em preparo de carreadores conjugados a haptenos, onde o principal objetivo é o desenvolvimento da resposta imunológica à biomolécula ligada, ocasionalmente, um percentual dos anticorpos produzido pode apresentar resposta imune ao ligante (crosslinker) utilizado na conjugação. Os agentes de comprimento zero podem ser considerados uma alternativa frente aos ligantes tradicionais, eliminando consideravelmente este tipo de reatividade cruzada, mediando uma ligação direta entre os dois compostos (HERMANSON, 2008; ULRICH, 2007; GUO *et al*, 2016).

O EDC é o reagente mais comumente utilizado na conjugação de compostos que possuem grupos carboxílicos e ou aminas. O Sulfo-NHS promove a solubilidade e estabilidade

do intermediário reativo durante a reação. Estes agentes de acoplamento apresentam elevada solubilidade em meio aquoso, o que permite o processamento da reação na ausência de solventes orgânicos, favorecendo assim, a remoção do bioconjugado e subprodutos através de diálise ou filtração em gel (APUD BRASIL JUNIOR, 2010).

Em estudos, Nakajima e Ikada (1995) verificaram que a ativação dos grupos carboxilatos ocorre de modo mais efetivo na faixa de pH 3,5 – 4,5, enquanto a formação da ligação amida apresenta rendimento mais elevado na faixa de pH 4,0 – 6,0, quando o antígeno é de natureza proteica (HERMANSON, 2008; ULRICH, 2007; NAKAJIMA & IKADA, 1995).

Analisando a amostra obtida no tempo de retenção 1,964, foi observado um decaimento na concentração do reagente (ácido gálico) ao longo da cinética. Quando verificamos o tempo de retenção 4,304, foi observado o deslocamento da reação favorecendo a formação do produto, ou seja, a conjugação dos reagentes, ácido gálico, as estruturas de mimetização do polissacarídeo, NANA e Inositol (Tabelas 7, 8 e 9).

Tabela 7: Curva padrão do tempo de retenção dos reagentes e produtos da reação de conjugação mimetizada

ANALITO	NHS	EDC	NANA	ÁC. GÁLICO	INOSITOL	CONJUGADO
<b>T<sub>R</sub> (min)</b>	<b>1,392</b>	<b>1,720</b>	<b>1,860</b>	<b>1,973</b>	<b>1,085</b>	<b>4,304</b>

Tabela 8: Áreas relativas correspondentes ao tempo de retenção dos reagentes, produtos e subprodutos da reação de conjugação mimetizada (NANA)

ÁREA RELATIVA								
ANALITO	1,964	3,29	4,019	4,304	4,946	5,648	7,244	9,082
T <sub>R</sub> (min)	1,964	3,29	4,019	4,304	4,946	5,648	7,244	9,082
15	63,19	1,59	0,25	31,17	0,16	3,13	0,51	
30	66,66	1,57	0,22	28,53	0,15	2,37	0,5	
60	62,15	1,58	0,3	32,23	0,17	3,04	0,53	
120	57,35	1,88	0,29	35,88	0,16	3,57	0,78	
150	58,91	1,91	0,28	33,55	0,13	3,71	1,01	0,42

Ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico (NANA))

-  Decaimento da conc. Ác. gálico
-  Formação de produto (conjugado)
-  Subprodutos

Para o reagente Inositol, o mesmo comportamento foi detectado, conforme

podemos verificar na Tabela 9:

Tabela 9: Áreas relativas correspondentes ao tempo de retenção dos reagentes, produtos e subprodutos da reação de conjugação mimetizada (INOSITOL)

		ÁREA RELATIVA								
ANALITO										
$T_R$ (min)	1,964	3,29	4,019	4,304	4,946	5,648	6,454	7,244	9,082	
15	73,33	1,27	0,22	22,41	0,11	2,21		0,46		
30	69,12	1,39	0,29	26,02	0,1	2,56		0,52		
60	75,76	1,06	0,25	20,53	0,08	1,94		0,38		
90	66,35	1,46	0,27	28,03	0,12	2,92	0,05	0,59	0,02	
120	61,02	1,75	0,35	31,26	0,16	3,81	0,12	1,04	0,49	
150	61,88	1,74	0,34	31,06	0,17	3,45	0,11	0,89	0,37	

Inositol

-  Decaimento da conc. Ác. gálico
-  Formação de produto (conjugado)
-  Subprodutos

### 6.3 – Cálculo do *Cutoff* do ELISA e da citometria de fluxo utilizados na pesquisa de anticorpos contra os polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W

A representação gráfica do *cutoff* do ELISA e da citometria de fluxo para os polissacarídeos A, C e W estão demonstrados na figura 24.

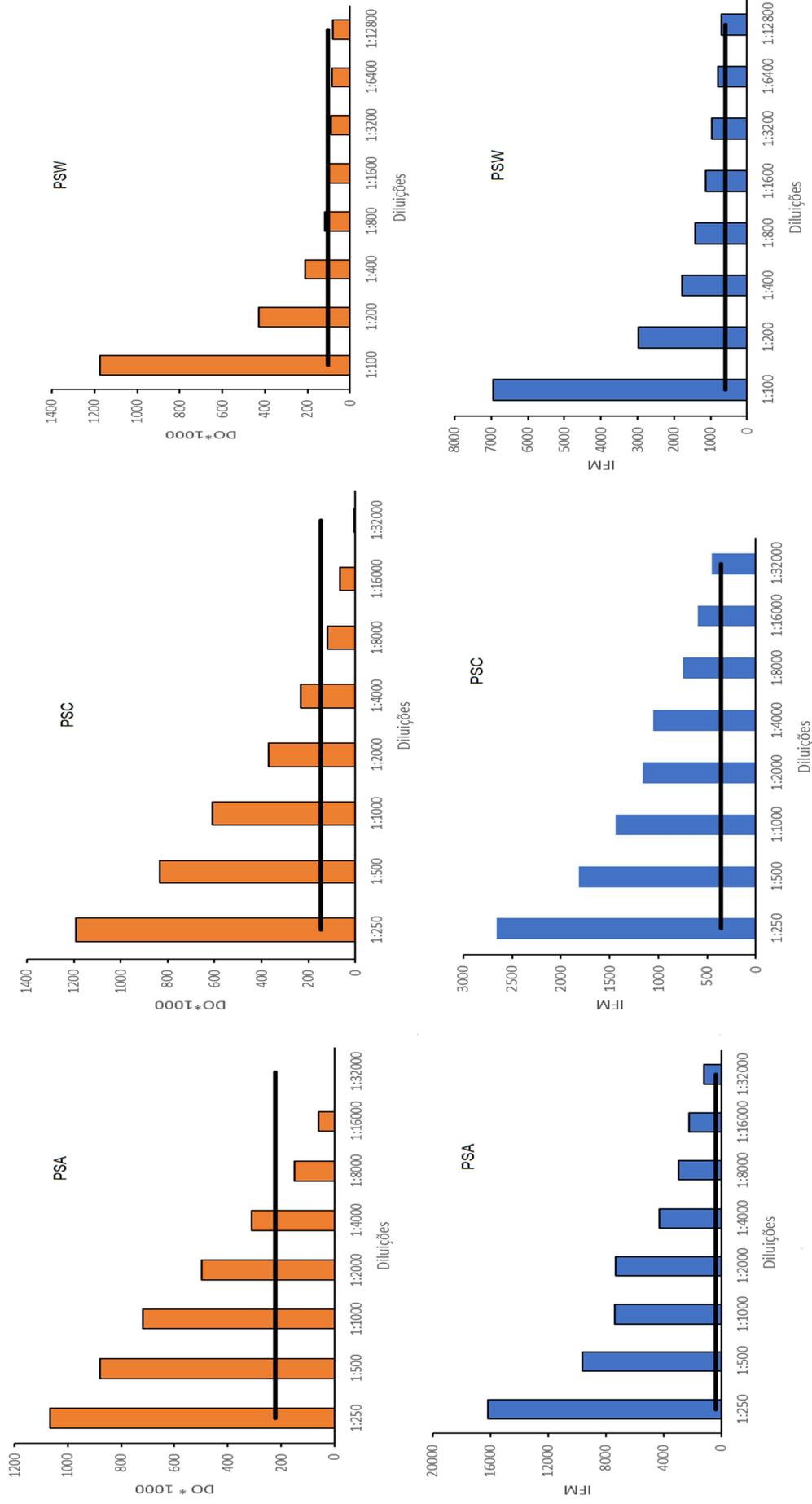


FIGURA 24: Representação do *Cutoff* para o ELISA e para Citometria de fluxo e na pesquisa do título de IgG total contra os polissacarídeos A, C e W de *Neisseria meningitidis*. As amostras representadas nos gráficos são diluições seriadas dos soros padrão PSA (1000UA/mL), PSC (808,36UA/mL) e PSW (1000UA/mL). A linha representa os valores de *Cutoff* para PSA ( ELISA: 0,62 UA/mL; Citometria de fluxo: 0,1UA/mL),PSC ( ELISA:0,47UA/mL; Citometria de fluxo:0,44UA/mL) e PSW ( ELISA: 0,33 UA/mL; Citometria de fluxo: 0,34UA/mL). D.O.(Densidade ótica). IFM (Intensidade de fluorescência média). (Transformação de D.O e IFM para UA/mL foi feita pelo Parâmetro Logístico 4 – SoftMax Pro v.5).

#### **6.4 - Detecção e quantificação dos anticorpos induzidos pelos pelos polissacarídeos dos grupos A, C e W de *Neisseria meningitidis* combinados na vacina Menveo® pela tecnologia multiparamétrica baseada em microesferas**

A metodologia multiparamétrica, baseada em microesferas como suporte sólido, tem sido muito utilizada no diagnóstico para várias doenças, desde leucemias a resposta imunológica a antígenos microbiológicos (SANTIAGO *et al*, 2016).

Após a padronização das concentrações ideais para os acoplamentos dos antígenos às microesferas carboxiladas, o título de anticorpos das amostras dos pools dos camundongos imunizados com a Vacina Menveo® foram analisadas no citômetro de fluxo para um único antígeno (ensaio monoparamétrico) e para os três antígenos combinados em um mesmo teste (ensaio multiparamétrico). Todos os experimentos foram realizados em paralelo com a amostra padrão, uma amostra negativa e uma amostra branco. As IFM foram convertidas em UA/mL pelo Programa Logístico 4.

Os ensaios analisados tanto na modalidade monoparamétrica quanto na multiparamétrica na técnica de citometria de fluxo apresentaram-se sensíveis podendo detectar títulos de IgG total a partir de 15 dias após a primeira dose da vacina (Figura 25).

Foram analisados os títulos de IgG total para os três polissacarídeos (PSC, PSA e PSW) separadamente e podemos observar um aumento significativo destes títulos 30 dias após a terceira imunização (T45) quando comparados aos resultados pré-ímmunes (T0) ( $p < 0,0001$ ) para o PSA, e um aumento significativo a partir do T30 (15 dias após a 2ª imunização) ( $p < 0,0001$ ) para PSC e PSW (Figura 25).

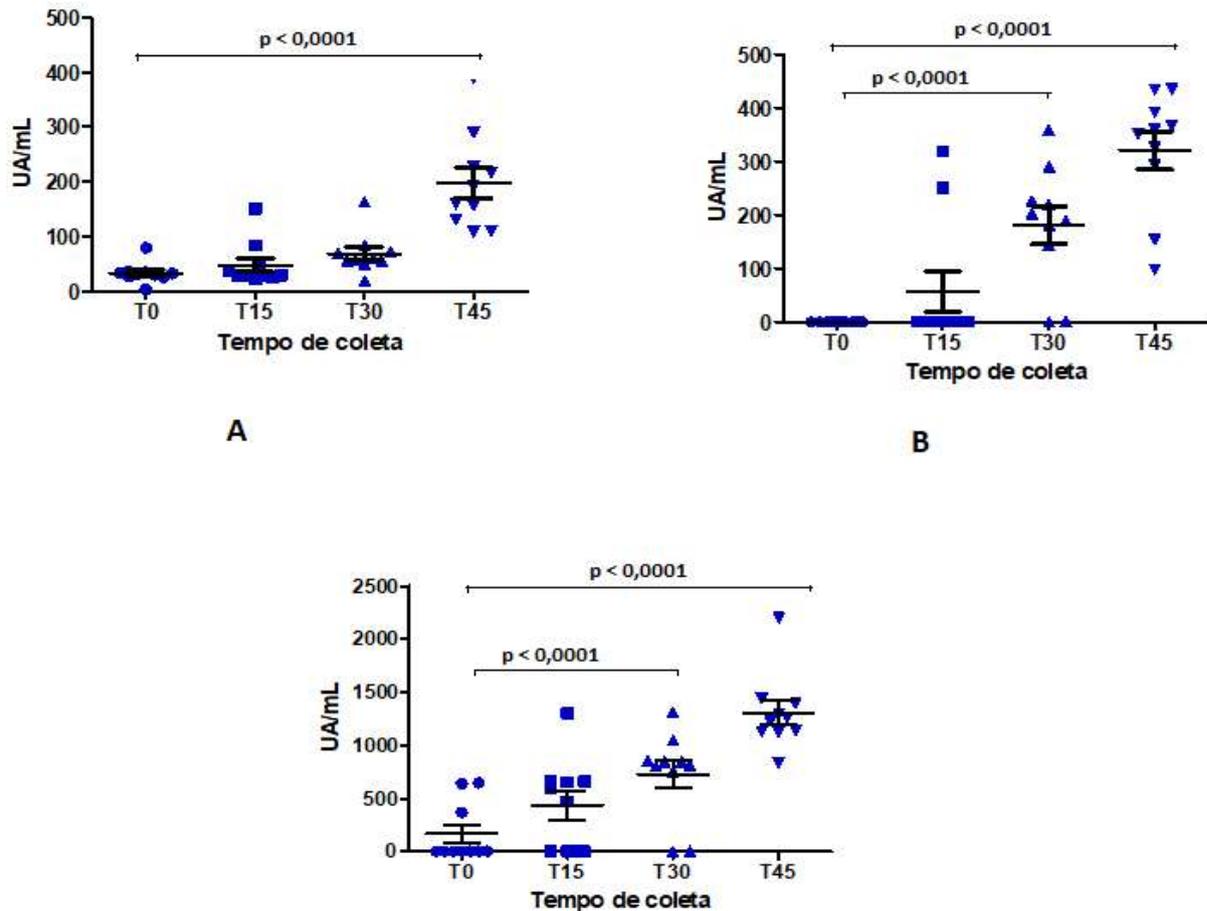


Figura 25: Quantificação dos títulos de IgG total para PSA (A), PSC (B) e PSW (C), a partir do soro de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo® por citometria de fluxo. Foi detectado um aumento significativo a partir do T45 para PSA ( $p < 0,0001$ ) e T30 para PSC e PSW ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao T0 (pré imune). O experimento foi realizado separadamente para cada polissacarídeo (teste monoparamétrico) (— mediana;  $\perp$  desvio padrão).

Ao analisarmos os níveis de IgG total contra os três polissacarídeos (PSA, PSC e PSW) concomitantemente (ensaio multiparamétrico), observamos uma diferença significativa a partir do T30 ( $p < 0,0001$ ) para o PSW e T45 para PSA e PSC ( $p = 0,0001$ ) quando comparados com os títulos pré-ímunes (T0) (Figura 26).

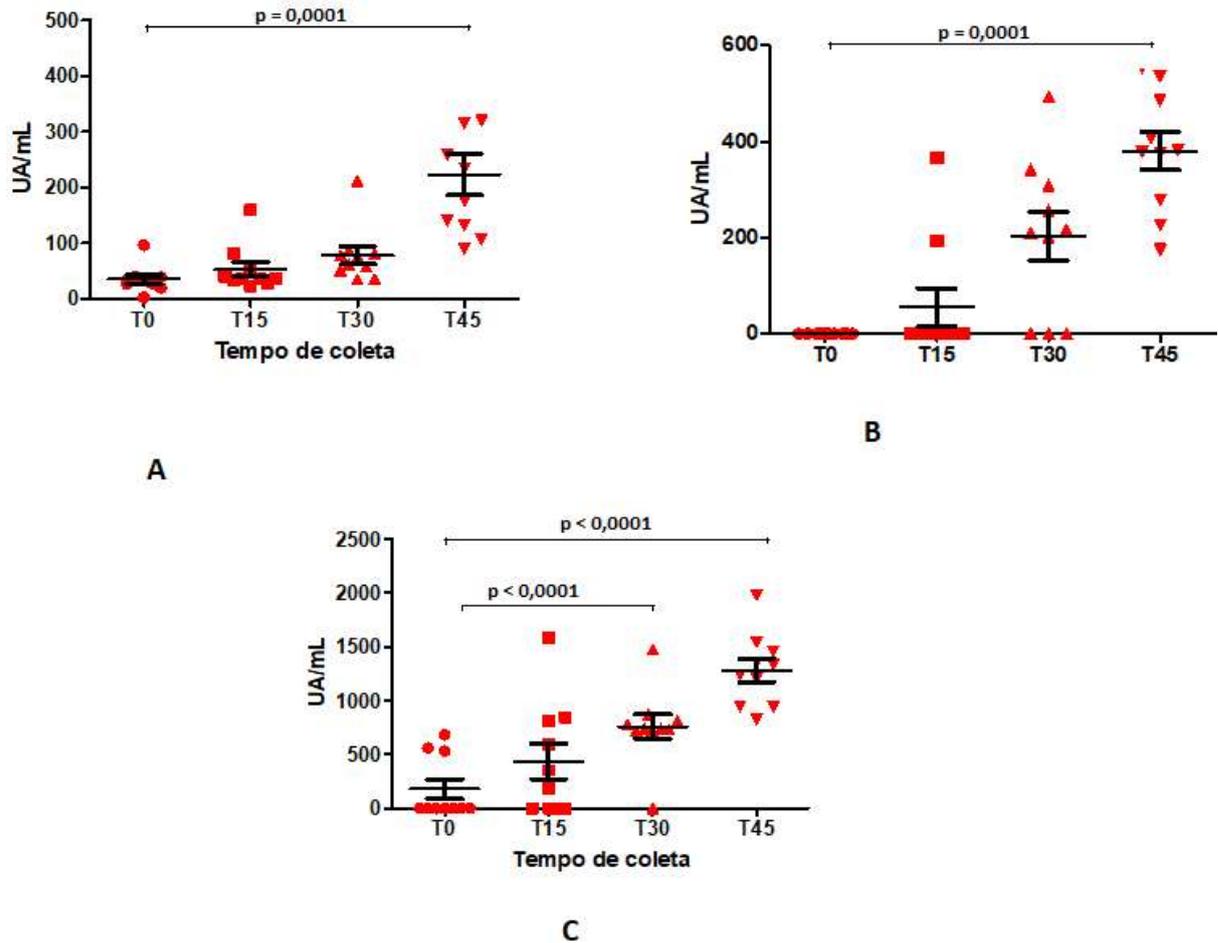


Figura 26: Quantificação dos títulos de IgG total para PSA (A), PSC (B) e PSW (C) concomitantemente, a partir do soro de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo® por citometria de fluxo. Foi detectado um aumento significativo a partir do T45 para PSA e PSC ( $p = 0,0001$ ) e T30 para o PSW ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao T0 (pré imune) (— mediana;  $\perp$  desvio padrão).

## 6.5 - Ensaios monoparamétricos e ensaios multiparamétricos

Estudos anteriores têm documentado a quantificação do título de anticorpos específicos para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* por ELISA e citometria de fluxo utilizando microesferas sensibilizadas com o antígeno, observando uma maior sensibilidade e rapidez na análise multiparamétrica (ONDINGO *et al*, 2012).

A possibilidade de interferência e reatividade cruzada entre os conjuntos de microesferas é uma consideração importante para os ensaios multiparamétricos (LAL *et al*, 2003; VOER *et al*, 2008). A comparação das IFMs geradas pelos ensaios mono e multiparamétricos demonstraram, contudo, que não ocorreu interferência entre os conjuntos de microesferas e a análise multiparamétrica não pareceu alterar a qualidade ou a sensibilidade dos ensaios (Figura 27).

Foram comparados os ensaios monoparamétricos e os multiparamétricos para as respostas de IgG total aos títulos gerados pelo PSA, PSC e PSW, entre si, e com o ELISA. Os testes monoparamétricos e os multiparamétricos, além de apresentarem uma alta correlação entre si, não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos após a análise das amostras sanguíneas murinas (PSA  $r=0,9885$   $p=0,483$ ; PSC  $r=0,9912$   $p=0,0809$ ; PSW  $r=0,9775$   $p=0,9657$ ) (Figura 27)

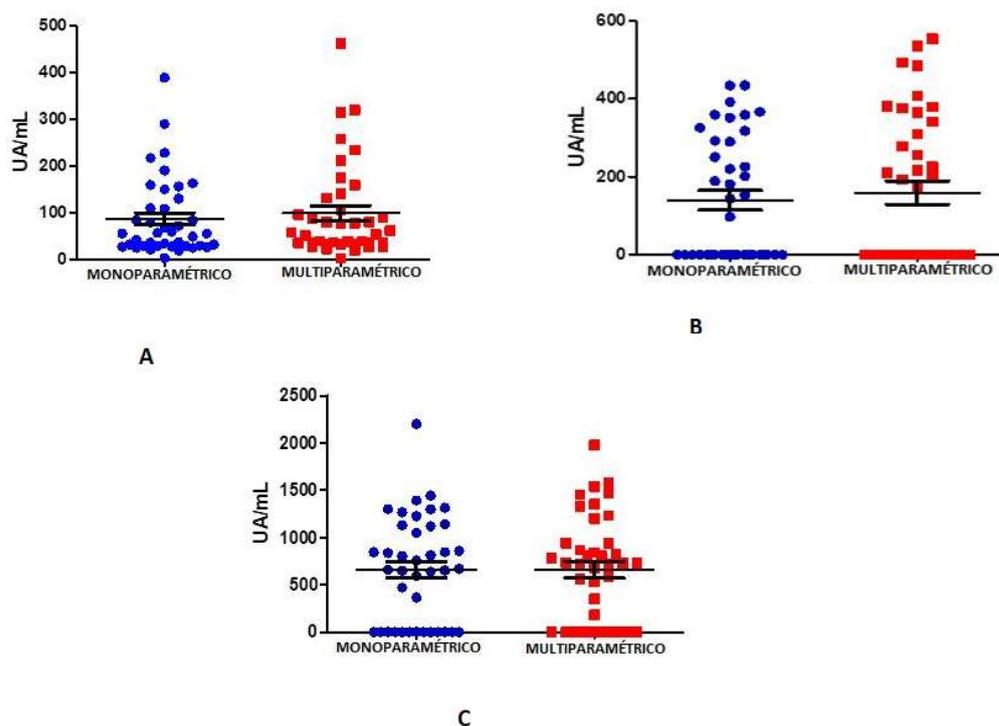


Figura 27 - Representa os títulos de IgG total contra os polissacarídeos A (A), C (B) e W (C) de *Neisseria meningitidis*, a partir de amostras sanguíneas de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo® pela citometria de fluxo (ensaios monoparamétricos e multiparamétricos (PSA  $r=0,9885$   $p=0,483$ ; PSC  $r=0,9912$   $p=0,0809$ ; PSW  $r=0,9775$   $p=0,9657$ ), foi utilizado o método de Spearman para avaliar a correlação dos ensaios e o Mann-Whitney, para avaliar se existe diferença estatística entre os ensaios.

Quando a mesma análise foi realizada em comparação ao ELISA, apesar de observarmos uma alta correlação entre as três análises, PSA  $r=0,9885$   $p=0,483$ ; PSC  $r=0,9912$   $p=0,0809$ ; PSW  $r=0,9775$   $p=0,9657$ ), foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a citometria de fluxo (monoparamétrica e multiparamétrica) e o ELISA (PSA ( $p=0,0001$ ), PSC ( $p=0,0189$ ), PSW ( $p=0,0011$ )), devido a uma menor sensibilidade observada no ensaio imunoenzimático, que não foi capaz de detectar títulos de IgG total a partir da 1ª imunização (T15) como a citometria

de fluxo (Figura 28). Esta superioridade da sensibilidade da citometria de fluxo também foi observada por Lal e colaboradores (2005) que conseguiram detectar uma concentração de anticorpo três vezes menor do que por ELISA. Em contrapartida a detecção destes títulos, induzidos pelos três polissacarídeos, começam a se equivaler 15 dias após a terceira imunização (T45) ( $p > 0,05$ ) (Figura 28).

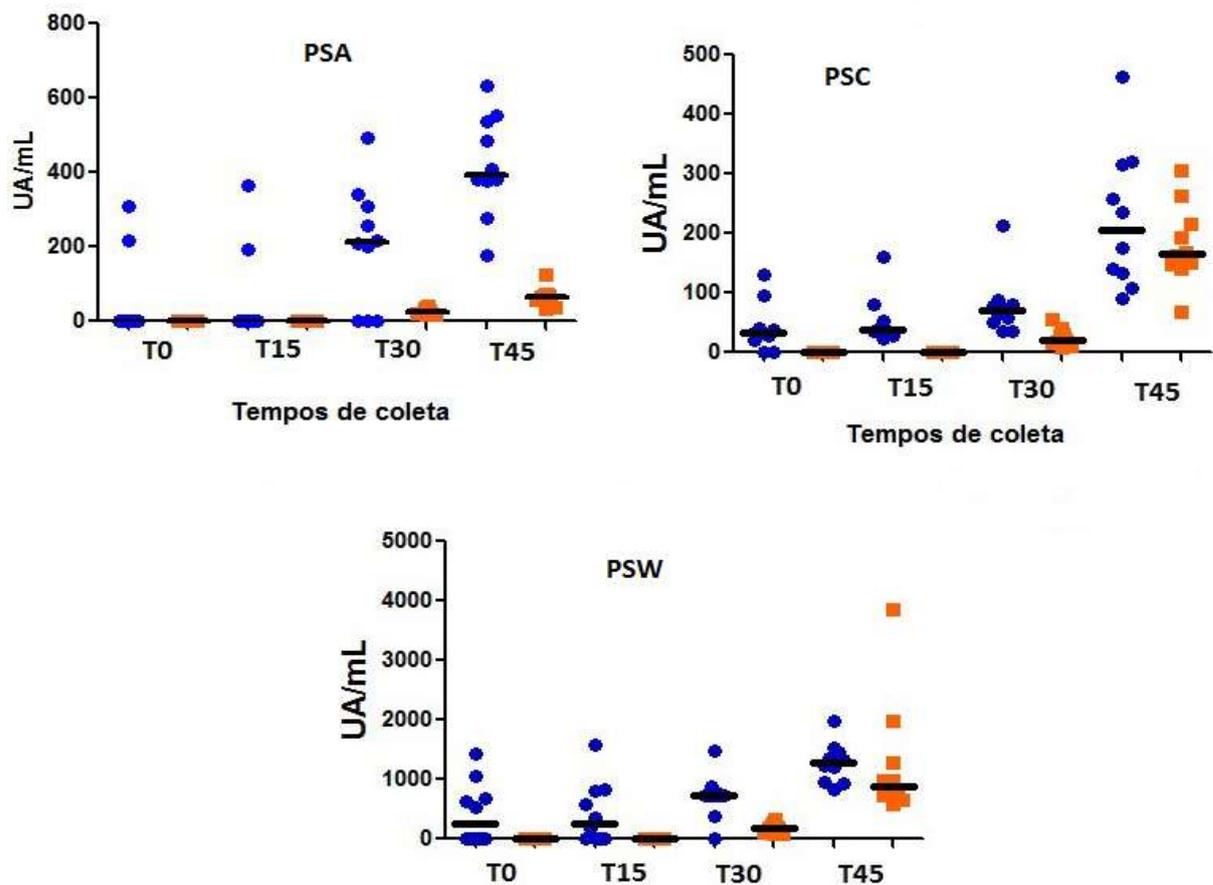
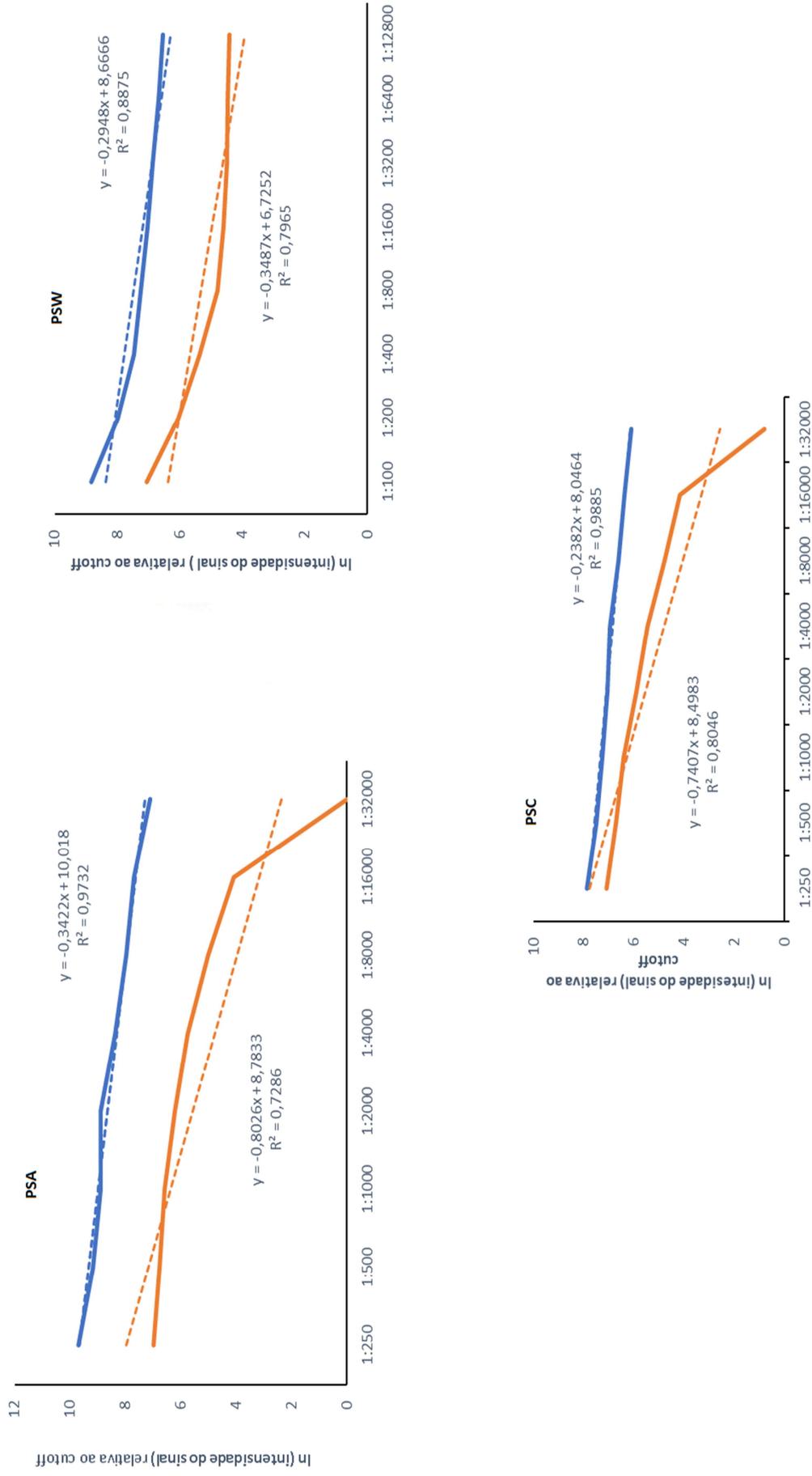


Figura 28 - Títulos de IgG total analisados por citometria de fluxo e ELISA, contra os polissacarídeos A (A) ( $p = 0,0001$ ), C (B) ( $p = 0,0189$ ) e W (C) ( $p = 0,0011$ ) de *Neisseria meningitidis*, a partir de amostras sanguíneas de camundongos suíços imunizados com a vacina Menveo®. A linha ( ) representa a Mediana. ELISA ■ e Citometria de fluxo ■

A sensibilidade entre os dois métodos pode ser detectada pela análise da curva padrão para os três polissacarídeos. Os valores de cada ponto da curva padrão, para ambos os métodos foram transformados em logaritmo natural ( $\ln$ ) e colocados em um gráfico, onde o eixo de x é considerado como o *cutoff*. A intersecção de curva com o eixo de x representa a mais alta diluição que o anticorpo é capaz de ser detectado no soro, determinando assim, o método mais sensível (MÖRTBERG *et al*, 2016; HELMBERG *et al*, 1997).



**Figura 29** - Comparação do resultado de oito etapas da diluição seriada dos soros padrão contra os polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A (A), W (B) e C (C) pelo ELISA ■ e pela citometria de fluxo ■. O eixo das abcissas representa o cutoff. A interseção com o eixo de x representa o menor título de anticorpo capaz de ser detectado pelos métodos. Os resultados estão expressos em ln. Os resultados do ELISA estão representados por ln de DO\*1000. ln (logaritmo natural); DO (densidade ótica).

Os gráficos anteriores (Figura 29) sugerem uma maior sensibilidade da citometria de fluxo para a quantificação dos títulos de anticorpos, induzidos pela vacina tetravalente conjugada comercial. Podemos observar que as curvas dos soros padrão para os polissacarídeos A e C de *Neisseria meningitidis* detectados pelo ELISA cortam o eixo das abcissas na diluição 1:32000, enquanto que a curva que representa os títulos detectados pela citometria de fluxo possui uma continuidade de detecção, sugerindo uma maior sensibilidade da metodologia multiparamétrica. Com relação ao polissacarídeo W podemos observar uma semelhança entre a sensibilidade dos dois métodos, pois não há o corte do eixo das abcissas pelas curvas (Figura 29).

Em avaliação ao tempo de execução das etapas dos ensaios do teste ELISA e o ensaio multiparamétrico, após as validações pertinentes aos grupos de interesse (PSA, PSC e PSW), observamos que para o estudo de dois ou mais antígenos o teste ELISA torna-se mais demorado e o quantitativo da amostra requerida é muito maior do que nas análises multiparamétricas por citometria de fluxo. Apesar da técnica multiparamétrica contar com equipamentos de alto custo (tais como o citômetro de fluxo) e mão-de-obra treinada é muito mais viável na análise imunológica para múltiplos antígenos, pois é menos laboriosa, com tempo menor de execução, quantitativo amostral otimizado e possibilita a análise de vários parâmetros simultaneamente (DIMASI, GRABONISKI & RANSEN, 2016) sendo fatores primordiais nas pesquisas de novas vacinas conjugadas e combinadas.

## 7 - CONCLUSÃO

- A sensibilidade do teste multiparamétrico em relação ao ELISA foi observado desde a primeira coleta pós-imunização, com a detecção dos níveis de IgG total nas amostras sanguíneas de alguns camundongos suíços acima dos níveis basais.
- O método monoparamétrico e o multiparamétrico apresentam uma alta correlação com ausência de diferença estatística, não apresentando uma interferência entre os PS acoplados, sem alterar a qualidade e a sensibilidade da detecção da resposta imunológica aos antígenos analisados.
- A tecnologia multiparamétrica por citometria de fluxo consegue agregar as

vantagens do ELISA em um único teste, sendo menos laboriosa, consumindo um menor tempo para sua execução e com um volume menor de amostra para análise.

- Ocorreu uma alta correlação entre o ELISA e o teste multiparamétrico, porém apresentando uma diferença estatística entre métodos devido a uma menor sensibilidade do teste imunoenzimático.

## 8 – REFERÊNCIAS

ALI A., JAFRI R.Z., MESSONIER, N., TEVI-BENISSAN, C., DURRHEIM, D., ESKOLA, J., FERMON, F., KLUGMAN, K.P., RAMSAY, M., SOW S, ZHUJUN S, BUTTHA, Z., ABRAMSON, J. - Global practices of meningococcal vaccine use and impact on invasive disease - **Pathog Glob Health**, Jan;108(1):11-20, 2014.

ANDRADE D.C., BORGES, I.C., LAITINEN, H., EKSTROM, A.P.V, MEINKE, A., BARRAL A, NASCIMENTO-CARVALHO CM, KAYHTY H. A fluorescent multiplex bead-based immunoassay (FMIA) for quantitation of IgG against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* protein antigens. **Jounal of Immunological Methods** 405: 130 – 143, 2014.

BASTOS RC, SOUZA IM, SILVA MN, SILVA FP, FIGUEIRA ES, LEAL ML, JESSOUROUN E, SILVA JUNIOR JG, MEDRONHO RA, SILVEIRA IAF. **Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies** - *Vaccine* 33 (35): 4281 – 4287, 2015.

BATISTA RS, GOMES AP, GAZINEO JLD, MIGUEL PSB, SANTANA LA, OLIVEIRA L, GELLER M. - Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 10(11): 1019 -1029, 2017.

BARNES GK, KRISTIANSEN PA, CAUGANT DA, NAESS LM. - Development and Evaluation of a Multiplex Microsphere Assay for Quantitation of IgG and IgA Antibodies against *Neisseria meningitidis* Serogroup A, C, W, and Y Polysaccharides. **Clin Vaccine Immunol**, Jul;22(7):697-705, 2015

BERTHO, A. L., FERRAZ, R.N. - **In: Apostila de Citometria de fluxo no estudo de doenças parasitárias**. Acesso em: 21 ago. 2018.

BORROW R, CARLONE GM, et al. *Neisseria meningitidis* group B correlates of protection and assay standardization. International Meeting Report Emory University, Atlanta, Georgia, United States, 16 – 17. **Vaccine** (24):5093 – 5107, 2006.

BORROW, R., ABAD, R., TROTTER, C., VAN DER KLIS, F.R., VAZQUES, J.A. Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes. **Vaccine** 23;31(41):4477-86, 2013.

BRASIL JÚNIOR, A. G. – **Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II IV** – Dissertação (Mestrado), 2010.

BRYNJOLFSON, S.F., BJARNARSON, S.P., MORI, E., DEL GIUDICE, G., JONSDOLTTIR, I. Neonatal immune response and serum bactericidal activity induced by a meningococcal conjugate vaccine is enhanced by LT – K63 and CpG2006, **Vaccine**; 26(35):4557 -62, 2008.

BRUGE, J., BOUVERET-LE, C.N., DANVE, B., ROUGON, G., SCHULZ, D. Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers. **Vaccine** 22: 1087-1096, 2004.

BUTLER, J.E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Immunoassay** 21 (2-3): 165 – 209, 2000.

CALLE, I.R., SÁNCHEZ, C.T., MARTINÓN-TORRES, F. Vacunas antimeningocócicas – Situación epidemiológica mundial y estrategias de prevención mediante la vacunación. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 33:257-67, 2015.

CARVALHO; FERRAZ; RIBEIRO & BERTHO - **Apostila de Citometria de Fluxo** – Ano 2013

CARTWRIGHT, K., NOAH, N., PELTOLA, H. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines - Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria. **Vaccine** 19: 4347-4356, 2000.

CHEN, P. S., JR., T. Y. TORIBARA, and H. WARNER. Microdetermination of phosphorus. **Anal. Chem.** 28: 1756- 1758, 1956.

DAGAN, R., POOLMAN, J., SIEGRIST, C.A. – Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. **Vaccine**, 28:5513 – 23, 2010.

DIMASI, J.A., GRABOWSKI, H.G., RANSEN, R.W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, Volume 47, Pages 20-33, 2016.

FERBAS, J., THOMAS, J., HODGSON, J., GAUR, A., CASADEVAL, L N., SWANSON, S.J. Feasibility of a multiplex flow cytometric bead immunoassay for detection of anti-Epoetin Alfa antibodies. **Clinical and Vaccine Immunology** 14 (9): 1165 – 1172, 2007.

FISHER M, HEDBERG K, CARDOSI P, PLIKAYTIS BD, HOESLY FC, STEINGART KR. Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. **Pediatr Infect Dis J** 16 (10): 979-983, 1997.

FRASCH, C.E., VAN ALPHEN, L., HOLTS, J., POOLMAN, J.T., ROSENQVIST, E. Outer Membrane Protein Vesicle Vaccines for Meningococcal Disease. In: AJ Pollard and MCJ Maiden **Methods in Molecular Medicine**, ed Wiley., 1995. vol 66. 975p.

GABRIEL, E.M. **Avaliação da resposta imunológica celular e humoral em camundongos induzida pela vacina Meningocócica C conjugada desenvolvida em Bio-Manguinhos / Fiocruz**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia em Imunobiológicos) – Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2017.

GASPARINI R, AMICIZIA D, LAI PL, PANATTO D. Meningococcal B vaccination strategies and their practical application in Italy. **J Prev Med Hyg**. 56(3):133-9. Review, 2015.

GHEESLING LL, CARLONE GM, PAIS LB, HOLDER PF, MASLANKA SE, PLIKAYTIS BD, ACHTMAN M, DENSEN P, FRASCH CE, KAYHTY H. Multicenter comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup C anti-capsular polysaccharide antibody levels measured by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol**. 32: 1475 – 82, 1994.

GIRARD MP, PREZIOSI MP, AGUADO MT, KIENY MP. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. **Vaccine**. 24(22):4692-700. Epub 2006 Mar 31. Review, 2006.

GOLDSCHNEIDER I, GOTSCHLICH EC, ARTENSTEIN MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of human antibodies. **J Exp Med**. 129: 1307 – 26, 1969.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J. & OSBORNE, B.A. Interações antígeno-anticorpo. In: \_\_\_\_\_ *Kuby Imunologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Revinter, 2002. Cap. 6, p.161 – 163.

GONZÁLEZ S, CABALLERO E, SORIA Y, COBAS K, GRANADILLO M, PAJÓN R. Immunization with *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles prevents bacteremia in neonatal mice. **Vaccine**. 24(10):1633-43, 2006.

GRANOFF DM, HARRISON LH, BORROW R. **Meningococcal vaccines**. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008. p. 399-434.

GUDLAVALLETI SK, LEE CH, NORRIS SE, PAUL-SATYASCELA M, VANN WF, FRASCH CE. Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. **Vaccine**. 14; 25 (46): 7972 – 7980, 2007.

GUO, P., ANDERSON, J.D., BOZELL, J.J., ZIZNOVIC, S. The effect of solvent composition on grafting gallic acid onto chitosan via carbodiimide. **Carbohydrate Polymers**. 140, 171 – 180, 2016.

HALPERIN AS, BETTINGER J A, GREENWOOD B, HARRISON LH, JELFS J, LADHANI SN. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**. 30(Supl 2): B26-B36, 2011.

HARRISON LH, TROTTER CL, RAMSAY, ME . Global epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**. 27 Suppl 2: 51-63, 2009.

HELMBERG, W; FOLSCH, B.; WAGNER, T., LANZER, G. Detection and differentiation of platelet-specific antibodies by flow cytometry: The bead-mediated platelet assay. **Transfusion**. Vol.37(5), pp.502-506, 1997.

HERMANSON, G. T. – Zero-Length Crosslinkers. In: \_\_\_\_\_ **BIOCONJUGATE TECHNIQUES** – 2<sup>nd</sup> edition, USA, ELSEVIER, 2008;part II,cap. 3, p. 215 - 228.

HOURI H, PORMOHAMMAD A, RIAHI SM, NASIRI MJ, FALLAH F, DABIRI H, POURIRAN R. Acute bacterial meningitis in Iran. Systematic review and meta-analysis. **PLOS One**. 12 (2), 2017.

[HTTPS://WWW.THERMOFISHER.COM/CONTENT/DAM/LAFETECH/IMAGES/INTERATION/ELISAFORMATS575x214.JPG](https://www.thermofisher.com/content/dam/lafetech/images/interaction/elisaformats575x214.jpg)

IWASAWA T., WASH P., GIBSON, C., REBEK JR., J. Reaction of an introverted carboxylic acid with carbodiimide. **ScienceDirect Tetrahedron**. 63 6506 – 6511, 2007.

JENNINGS HJ & LUGOWSKI C. Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide – tetanus toxoid conjugates. **J Immunol** 127: 1011–1018, 1981.

JESSOURON E, SILVEIRA IFB, LARANGEIRA AP, PEREIRA S, FERNANDES SA, RABINOVITCH L, FRASCH CE, CASTRO-FARIA-NETO HC, BOZZA PT. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. **Vaccine**.22: 2617 – 25, 2004.

JESSOURON, Ellen; DA SILVA, Ivna Freitas; BASTOS, Renata Chagas, FRASCH,

Carl E., LEE, Che-Hung. **Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines.** WO2005/037320 A2,2005 [Patente]

JOSEFSBERG JO, BUCKLAND B. Vaccine process technology. **Biotechnol Bioeng.** 109(6):1443-60, 2012.

KINLOCK AJ, KAIVER Y, WOLFGEHER D, AI J, EKLUND A, CLARK MR, GRUNEWALD J. In situ humoral immunity to Vimentin in HLA-DRB1\*03+ patients with pulmonar Sarcoides. **Frontiers Immunol.** 9: 1516, 2018.

KOUTANGNI T, BOUBACAR MH, MUELLER JE. Incidence, carriage and case-carrier ratios for meningococcal meningitis in the African meningitis belt: a systematic review and meta-analysis. **PloS One.** 10(2): 0116725, 2015.

KUGELBERG E, GOLLAN B, TANG CM. Mechanisms in *Neisseria meningitidis* for resistance against complement-mediated killing. **Vaccine.** 26 (6): 134 – 139. **Clinical and Vaccine Immunology.** Vol. 11(2),p.272, 2008.

LAHER, G., BALMER, P., GRAY, S. J., DAWSON, M. , KACZMARSKI,E.B. & BORROW,R. Development and evaluation of a rapid multianalyte particle-based flow cytometric assay for the quantification of meningococcal serogroup B-specific IgM antibodies in sera for nonculture case confirmation. **FEMS Immunol Med Microbiol .**48 34 –43, 2006.

LAFORCE FM, DIJINGAREY M, VIVIANI S, PREZIOSI MP. Successful African introduction of a new Group A meningococcal conjugate vaccine: Future challenges and next steps. **Hum Vaccin Immunother.** 14(5):1098-1102, 2018.

LAL G, BALMER P, STANFORD E, MARTIN S, WARRINGTON R, BORROW R. Development and validation of a nonplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine *Streptococcus pneumoniae* serotypes. **J Immunol Methods.** 296 (1-2): 135 – 147, 2005.

LEE C-H, K W-C, BERI S, KAPRE S, JOSHI JS, BOUVERET N, LA FORCE FM,

FRASCH CE. Preparation and characterization of an immunogenic meningococcae group A conjugate vaccine for use in Africa. **Vaccine**. Volume 27, issue 5, 726 – 732, 2009.

LEE CH, FRASCH CE. Quantification of bacterial polysaccharides by the purpald assay: measurement of periodate-generated formaldehyde from glycol in the repeating unit. **Anal Biochem**. 296(1):73-82, 2001.

LEMERCINIER X, JONES C. Full <sup>1</sup>H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. **Carbohydr Res**. 296:83-96, 1996.

LIRA, S.A. **Análise de correlação: Abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações**. 2004. (Dissertação de mestrado). Universidade do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

MACNEIL JR, BENNETT N, FARLEY MM. Epidemiology of infant meningococcal disease in the United States, 2006-2012. **Pediatrics**. 135, e305-e311, 2015.

MCINTOSH, E., DG, BROKER, M., WASSIL, J., WELSH, J.A., BORROW, R. Serum bactericidal antibody assays – The role of complement in infection and immunity. **Vaccine**. Volume 33, Issue 36, Pages 4414-4421, 2015.

MILLAR BC, MOORE PJA, MOORE JE. Meningococcal disease: has the battle been won? **J R Army Med Corps**. 63(4):235-241, 2017.

MIRLASHARI MR, HOIBY EA, HOLST J, LYBERG T. Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis* - **APMIS**. 10(3):193-204, 2002.

MOLINARO, E M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 4 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fatima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

MOND, JJ, VOS, Q, LEES, A., SNAPPER, CM. T cell independent antigens. **Curr. Opin. Immunol.** 7,349 – 354, 1995.

MOORE OS. Meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process. **Clin Infect Dis.**14(2): 515 – 525, 1992.

MORAGA, F. **Enfermedad Meningocócica: Passado, Presente e Futuro.** Publisher: Sant Hilari Sacalm (Girona): Grafiques Montseny; Editors: Moraga- Llop A., Martinon-Torres F, pp.9-31, 2013.

MORLEY SL, POLLARD AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? **Vaccine.** 20(5-6):666-87. Review, 2001.

MOROZOV VN, MOROZOVA TY. Active bead-linked immunoassay on protein microarrays. **Anal Chim Acta.** 564(1):40-52, 2006.

MÖRTBERG A, MEINKE S, BERG P, KILLIE MK, KIELDSEN-KAGH J, JARAS K, REFSUM E, HOGLUND P, WIKMAN A. Sensitive detection of platelet- specific antibodies with a modified MAIPA using biotinylated antibodies and streptavidin-coated beads. **Journal of Immunological Methods.** 434: 9 -15, 2016.

NAKAJIMA, N., YKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chem.**6 (1), pp 123–130, 1995.

ONDINGO, B.N., PARK, G.S., GOSE, S.O., HO, B.M., OCHOLA, L.A., AYODO, G.O., OFULLA, A.V., JOHN, C.C. Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* recombinant antigen. **Malaria Journal.** 11:427, 2012.

PACE D, POLLARD AJ, MESSONUR NE. Quadrivalent meningococcal conjugate vaccines. **Vaccine.** 27(5): B30-B41, 2009.

PAVLIAKOVA D, GIARDINA PC, MOGHAZEH S, SEBASTIAN S, KOSTER M, PLAVIAK V, MCKEEN A, FRENCH R, JANSEN KU, PRIDE M. Development and

Validation of 13-plex Luminex-Based Assay for Measuring Human Serum Antibodies to *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharides. **mSphere**.3(4). pii: 00128-18, 2018.

PELTON, S. I. The Global Evolution of Meningococcal Epidemiology Following the Introduction of Meningococcal Vaccines. **Journal of Adolescent health**. Volume 59, Issue, Supplement, Pages S3-S11, 2016.

PERRAUTR, RICHARD V, VARELA ML, TRAPE JF, GUILLOTTE M, TALLA, TOURE A, SOKHNA C, VIGAN-WOMAS I, MERCEREAU-PUIJALON O. Comparative analysis of IgG responses to *Plasmodium falciparum* MSP1p19 and PF13-DBL1 $\alpha$ 1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX®-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. **Malaria Journal**. 13: 410 – 420, 2014.

PERRET, K.P., JIN, C., CLUTTERBUCK, E., JOHN, T.M., WINTER, A.P., KIBWARA, E., YU L-M, CURTIS, N., POLLARD, A.J. B cell memory to a serogroup C meningococcal conjugate vaccine in childhood and response to booster: little association with serum IgG antibody . **J Immunol**.189:2673 – 81, 2012.

PICCINI G, TORELLI A, GIANCIECCHI E, PICCIRELLA S, MONTOMOLI E. Fighting *Neisseria meningitidis*: past and current vaccination strategies. **Expert Rev Vaccines**. (11):1393-1407, 2016.

POLLARD, A.J.; GOLDBLATT, D. Immune Response and Host-Pathogen Interactions. **Meningococcal Vaccines** pp 23-39, 2001.

PRICE GA, HOLLANDER AM, PLIKAYTIS BD, MOCCA BT, CARLONE G, FINDLOW H, BORROW R, SOW SO, DIALLO A, IDOKO OT, ENWERE GC, ELIE C, PREZIOSI MP, KULKAMI PS, BASH MC. Human complement bactericidal responses to a group A Meningococcal Conjugate Vaccine in Africans and comparison to responses measured by 2 other group A immunoassays. **Clin Infect Dis**. 61 Suppl 5: S554 – 562, 2015.

QUAKYI EK, HOCHSTEIN HD, TSAI CM. Modulation of the biological activities of meningococcal endotoxins by association with outer membrane proteins is not inevitably linked to toxicity. **Infect Immun.** 65(5):1972-9, 1997.

RAYMOND J. Bactériologie de *Neisseria meningitidis* - *Neisseria meningitidis*: characterisation and epidemiology. Volume 19, Supplement 2, Pages S55-S60, 2012.

REQUEJO, H. I. Z. **A Meningite Meningocócica no Mundo.** Editora: Edições Inteligentes, 2005.

RIGATO, P.O., BRITO, C.A. Quantificação de antígenos de superfície celular e ensaios multiplex – In: Duarte, A.J.S., Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. Editora Ateneu, Série da pesquisa à prática clínica, SP, 2013, p. 35 – 42.

ROSENSTEIN N. Commentary: Opportunities to decrease mortality and long-term sequelae associated with meningococcal disease in Africa. **Int J Epidemiol.**30(6):1447-8, 2001.

RUIJINE, N., LEA, R.A., O'HALLAHAN, J., OSTER, P., MARTIN, D. Understanding the immune responses to the meningococcal strain-specific vaccine MenNZB measured in studies of infants. **Clinical and Vaccine Immunology.** 13(7):797 – 801, 2006.

SÁFADI M.A., BARROS A.P. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **J Pediatr (Rio J).** 82(3 Suppl): S35-44, 2006.

SÁFADI MA, BEREZIN EN, OSELKA GW. A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines. **J Pediatr (Rio J).** May;88(3):195-202, 2012.

SALES, M.M., MORAES - VASCONCELOS, D., DUARTE, A.J.S. Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. In: Duarte, A.J.S., Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. Editora Ateneu, Série da pesquisa à prática clínica, SP, 2013, p.21 - 28.

SANTIAGO, M. A., DE PAULA FONSECA, E., FONSECA, B., DA SILVA MARQUES C.F., DOMINGOS DA SILVA, E., BERTHO, A.L., NOGUEIRA, A.C. Flow cytometry as tool for quality control of fluorescent conjugates used in immunoassays. **PlosOne** . 11(12): 0167669, 2016.

SEGAL S, POLLARD AJ. The last of the meningococcus? **Adv Exp Med Biol.**; 549:201-9. Review, 2004.

SBIM. Disponível em: <<https://familia.sbim.org.br/doencas/88-doenca-meningococica-dm>> Acesso em 03.11.2018.

SILVEIRA IAFB, BASTOS RC, NETO MS, LARANGEIRA AP, ASSIS EF, FERNANDES SAR, LEAL ML, SILVA WC, LEE CH, FRASCH CE, PERALTA JM, JESSOUROUN E. Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid. **Vaccine**. 25: 7261-7270, 2007.

SINAN. Disponível em <[www.saude.gov.br/SINAN](http://www.saude.gov.br/SINAN)> Acesso em 2015.

SMITH, S.G., SMITS, K., JOOSTEN, S.A., VAN MEIJGAARDEN, K.E., SATTI, I., FLETCHER, H.A., CACCAMO, N., DJELI, F., MASCART, F., MCSHANE, H., DOCKRELL, H.M., OTTENHOFF, T.H.M., TBVITBBIOMARKERWORKINGGROUP- Intracellular Cytokine Staining and Flow Cytometry: Considerations for Application in Clinical Trials of Novel Tuberculosis Vaccines. **PLOS One**. 14: 1 - 20, 2015.

SORIANO-GABARRÓ M, WOLTER J, HOGEA C, VYSE A. Carriage of *Neisseria meningitidis* in Europe: a review of studies undertaken in the region. **Expert Rev Infect Ther**. (9): 761-774, 2011.

SRIDHAR, S., GREENWOOD, B., HEAD, C., PLOTKIN, S.A., SÁFADI M.A., SAHA, S., TAHA, MK, TOMORI, O, GESSNER BD . Global incidence of serogroup B invasive meningococcal disease: a systematic review. **Lancet Infect Dis**. 15(11):1334-46, 2015.

STEPHENS, D.S. Conquering the Meningococcus. **FEMS Microbiology Reviews**. Volume 31, Issue 1, Pages 3–14, 2007.

SVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. **Biochim Biophys Acta**. 24(3):604 -11, 1957.

TAHA MK, GIORGINI D, DUCOS-GALANDI M, ALONSO JM. Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000. **J Clin Microbiol**. 42(9):4158-63, 2004.

TONTINI M, BERTI F, ROMANO MR, PROIETTI D, ZAMBONELLI C, BOTTOMLEY MJ, DE GREGORIO E, DEL GIUDICE G, RAPPUOLI R, CONSTANTINO P; STUDY GROUP, BROGIONI G, BALOCCI C, BIANCUCCI M, MALITO E. Comparison of CRM<sub>197</sub>, diphtheria toxoid and tetanus toxoid as protein carriers for meningococcal glycoconjugate vaccines. **Vaccine**. 31(42):4827-33, 2013.

ULRICH, H. Chemistry and Technology of carbodiimides. 1<sup>a</sup> edition, USA, Wiley, 2007.

VAZ, A.J., TAKEI, K., BUENO, E.C. Imunoensaios: fundamentos e aplicações, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

VOER RM, VAN DER KLIS FR, ENGELS CW, RIJKERS GT, SANDERS EA, BERBERS GA. Development of a fluorescent-bead-based multiplex immunoassay to determine immunoglobulin G subclass responses to *Neisseria meningitidis* serogroup A and C polysaccharides. **Clin Vaccine Immunol**. (8):1188-93, 2008.

WATSON R, LINDNER S, BORDEREAU P, HUNGE E.M., TAK, F., NGO S, ZIPFEL PF, SKERKA C, DUREY MAD, MARCHBLANK KJ. Standardisation of the factor H autoantibody assay. **Immunobiology**. 219 (1): 9 – 16, 2014.

WHO. Disponível em <[www.int/entity/mediacentre/factsheets/fs378/es/2015.1](http://www.int/entity/mediacentre/factsheets/fs378/es/2015.1)> Acesso em 18.08.2018.

WHO. Disponível em <meningococcaldiseases,  
www.who.int/csr/disease/meningococcal/en/ 2015> Acesso em: 18.08.2018.

WEICHSELBAUM, A. Ueber die Aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis. **Fortschr Med.** 5:573–583, 1887.