THAÍS REGINA BRIENZA LATARO

Utilização de anticorpos monoclonais como diferenciais de meningites bacterianas e virais pela técnica de Imuno-histoquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2016

THAÍS REGINA BRIENZA LATARO

Utilização de anticorpos monoclonais como diferenciais de meningites bacterianas e virais pela técnica de Imuno-histoquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP. (BDTD)

São Paulo

2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Brienza Lataro, Thaís Regina
Utilização de anticorpos monoclonais como diferenciais de meningites bacterianas e virais pela técnica de Imuno-histoquímica / Thaís Regina Brienza Lataro; orientadora Elizabeth De Gaspari . -- São Paulo, 2016.
82 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Meningite . 2. Neisseria meningitidis . 3. Anticorpos Monoclonais . 4. Imuno-histoquímica . 5. Vigilância Epidemiológica. I. De Gaspari , Elizabeth , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Thaís Regina Brienza Lataro

Título da Dissertação: Utilização de anticorpos monoclonais como diferenciais de meningites bacterianas e virais pela técnica de Imuno-histoquímica

Orientador(a): Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE DOIS ANTICORPOS MONOCLONAIS EM ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA MENINGITES

Pesquisador: Elizabeth Natal De Gaspari

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 22581214.9.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 718.072

Data da Relatoria: 17/07/2014

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 03/06/2014.

Objetivo da Pesquisa:

Texto do documento "PB Informações Básicas do Projeto", de 01/07/2014, transcrito na íntegra, a seguir.

"Objetivo Primário:

Avaliação de dois hibridomas murinos secretores de anticorpos monoclonais produzidos em nosso laboratório contra antígenos de Neisseria meningitidis produzidos e caracterizados em nosso laboratório em estudo imunohistoquimico no Centro de Patologia ,laboratório de imunohistoquímica do Instituto Adolfo Lutz.

Objetivo Secundário: Pretende-se, padronizar e estabelecer um protocolo para pesquisa imuno-histoquímica de antígenos de N.meningitidis e incrementar o diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não houve confirmação, por técnicas biomoleculares como o PCR, da presença do agente causador desta doença."

Para análise ética, a seguir.

Objetivo Primário

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Avaliar dois hibridomas murinos secretores de anticorpos monoclonais contra antígenos de Neisseria meningitidis.
Objetivos Secundários
Padronizar e estabelecer um protocolo para pesquisa imuno-histoquímica de antígenos de N.meningitidis.
Incrementar o diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 03/06/2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Análise com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 03/06/2014 e nos documentos submetidos na Plataforma Brasil em 01/07/2014.

A pesquisadora responsável revisou o documento "PB Informações Básicas do Projeto", especificamente objetivo, metodologia e número de participantes (representados por amostras biológicas), explicitando as etapas da pesquisa para atender a proposta do estudo.
Trata-se de pesquisa com material biológico humano armazenado e sob a guarda do Centro de Imunologia e do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Análise com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 03/06/2014 e nos documentos submetidos na Plataforma Brasil em 01/07/2014.

1.Termo de compromisso da pesquisadora responsável
Documento apresentado com ciência e concordância com as diretrizes da Resolução CNS 466/2012.

Recomendações:
Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Nesta revisão ética considerou-se o conjunto dos documentos submetidos na Plataforma Brasil e esclarecimentos da pesquisadora responsável em atividade consultiva presencial com a coordenadora do CEPIAL.
A pesquisadora responsável respondeu satisfatoriamente todos os questionamentos apontados no parecer anterior, bem como revisou o protocolo de pesquisa, especificamente reformulando o

documento "PB Informações Básicas do Projeto" e anexando os documentos complementares exigidos pelo CEPIAL.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em 24 de junho de 2014, Elizabeth Natal De Gaspari, pesquisadora responsável, e Luz Marina Trujillo, coordenadora do CEPIAL, reuniram-se para esclarecimentos sobre o parecer consubstanciado de 03/06/2014 em situação de "pendente".

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 em sessão extraordinária do CEPIAL de 10 de julho de 2014.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Continuação do Parecer: 718.072

SAO PAULO, 15 de Julho de 2014

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Dedico todo o meu trabalho e esforço a minha mãe e meu irmão, Sílvia Brienza e Matheus Brienza e ao meu namorado, Diego Condado, por estarem sempre ao meu lado. A palavra "obrigada" significa gratidão, mas não expressa por completo o quanto o apoio de vocês foi e sempre será importante para mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de crescimento profissional que este mestrado me proporcionou.

A Minha Querida Mãe, Sílvia Regina, pela ternura, amor, compreensão e dedicação a mim neste período do mestrado, por acreditar no meu sonho e sonhar junto comigo!

Ao meu namorado, Diego Condado, por seu amor, carinho e companheirismo, por estar sempre ao meu lado!

Ao meu irmão, Matheus, pela grande força e carinho.

À Dra Elizabeth Natal De Gaspari, minha orientadora, pela enorme colaboração científica e disponibilidade durante o desenvolvimento do trabalho e caráter profissional.

Ao Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, a todos que de alguma forma auxiliaram no trabalho.

As minhas amigas Fernanda Ayane e Adriana Almeida, pela força, carinho e auxílio nos momentos mais difíceis.

Ao Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Dra Sonia Maria Pereira de Oliveira, diretora do Centro de Patologia e à Dra Maria Lucia Utagawa, diretora do Núcleo de Anatomia Patológica, pelo apoio ao trabalho.

A Cristina Takami Kanamura, pela ajuda e colaboração no trabalho.

A Cinthya dos Santos Cirqueira, pela ajuda na condução das atividades laboratoriais, pela generosidade e companheirismo.

À Dra Roosecelis Araújo Brasil e à Dra Sílvia D'Andretta Iglezias, médicas Patologistas, pelo apoio técnico científico na aplicabilidade da técnica de imuno-histoquímica no trabalho.

A Júlia de Carvalho e a Silvana de Mello Pereira da Silva pelos apoios técnicos ao projeto, do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

Aos amigos do Instituto Adolfo Lutz, pelo acolhimento e amizade.

À Universidade de São Paulo, pelo suporte teórico, ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, pelo grande apoio e realização, e a CAPES pela bolsa de estudos oferecida.

Este Trabalho foi realizado com o apoio financeiro FAPESP 12/15568-0

A todos os demais aqui não mencionados, que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a estruturação e sucesso dessa dissertação.

RESUMO

LATARO, T. R. B. **Utilização de anticorpos monoclonais como diferenciais de meningites bacterianas e virais pela técnica de Imuno-histoquímica.** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Meningite é um grupo de doenças infecciosas que constituem um problema global sério à saúde, tendo uma grande relevância social pelas altas taxas de mortalidade que esta doença pode causar. A descrição da progressão da doença, do agente causador e dos sintomas está bem estabelecida, no entanto, as fases iniciais da doença e todo o processo de infecção ainda não é compreendido. O desenvolvimento de diagnósticos laboratoriais mais rápidos e efetivos têm sido promissores. Este trabalho aborda a utilização de anticorpos monoclonais para o diagnóstico por meio da técnica de imuno-histoquímica. Os anticorpos monoclonais foram obtidos durante fusões utilizando-se células esplênicas, linfócitos B contra antígenos de *N.meningitidis*. Os anticorpos foram utilizados em estudo imuno-histoquímico (IHQ) utilizando amostras de tecidos fixados em formol de pacientes com suspeita de meningite ou meningococcemia, no período de 2009 a 2015. Nosso intuito com este projeto é incrementar o diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não houve confirmação por técnicas biomoleculares, como o PCR, da presença do agente causador desta doença. Estabelecemos um protocolo para a pesquisa de antígenos de *N.meningitidis*, conforme padronizado para a reação de IHQ. Nosso trabalho obteve bons resultados, os dois anticorpos monoclonais quando aplicados na reação de IHQ, não apresentaram reatividade cruzada com meningite bacteriana e viral, causadas por outros agentes etiológicos quando utilizamos DAB ou Fast Red como cromógenos. Portanto o uso dos anticorpos em conjunto com a técnica de IHQ se mostrou uma ferramenta de saúde pública auxiliando a vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. Anticorpos monoclonais. Imuno-histoquímica

ABSTRACT

LATARO, T. R. B. **Use of monoclonal antibodies such as bacterial and viral meningitis differentials by Immuno-histochemistry.** 2016. 82 f. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Meningitis is a group of infectious diseases that compose a serious global health problem, having a great social relevance by high mortality rates that this disease can cause. The description of the disease progression, the causative agent and the symptoms is well established, however, the early stages of the disease and the infection is not yet understood. The development of faster and effective laboratory diagnoses have been promising. This paper discusses the use of monoclonal antibodies for diagnosis by means of the technique of Immunohistochemistry. Monoclonal antibodies were obtained during mergers using splenic cells, B lymphocytes against antigens of *N. meningitidis*. The antibodies were used in studies immunohistochemical (IHC) using formalin-fixed tissue samples from patients with suspected meningitis or meningococcemia, during the period from 2009 to 2015. Our aim with this project was to increase the histopathological diagnosis of meningococcal meningitis, especially in situations where there has been no confirmation by biomolecular techniques, such as PCR, of the presence of the causative agent of this disease. We have established a protocol for detecting antigens of *N. meningitidis*, as standardized to the IHC. The result obtained was very promising, the two monoclonal antibodies obtained good results. There was no cross-reactivity with bacterial and viral meningitis, caused by other etiological agents when using DAB or Fast Red as chromogens. Therefore the use of antibodies in conjunction with IHQ technique proved to be a public health tool aiding the epidemiological surveillance.

Keywords: *Neisseria meningitidis*. Monoclonal antibodies. Immuno-histochemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de colonização ao longo dos vasos sanguíneos pela bactéria *N. meningitidis*..... **21**

Figura 2 - Visão global dos sorogrupos de *N. meningitidis*..... **29**

Figura 3 - Gráfico da distribuição percentual da doença meningocócica por sorogrupo no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2015..... **31**

Figura 4 - Gráfico da incidência da doença meningocócica por faixa etária no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2015..... **32**

Figura 5 - Esquema de produção de anticorpos monoclonais a partir da inoculação do antígeno em camundongo. Meio HAT: Hipoxantina, Aminopterina e Timidina..... **34**

Figura 6 - Fluxograma do Protocolo da Reação de Imuno-histoquímica..... **46**

Figura 7 - Incidência por sexo da meningite bacteriana (esquerda) e meningite viral (direita), relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL..... **48**

Figura 8 - Incidência por sazonalidade da meningite bacteriana (esquerda) e meningite viral (direita) relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL..... **49**

Figura 9 - Distribuição por faixa etária da meningite bacteriana relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL..... **50**

Figura 10 - Distribuição por faixa etária da meningite viral relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL..... **50**

Figura 11 - Prevalência dos sorogrupos nos últimos 6 anos dos dados levantados no NAP-IAL..... **51**

Figura 12 - Gráfico das suspeitas que confrontavam com a meningite ou a meningococcemia dos 320 casos levantados no NAP-IAL, no período de 2009 a 2015..... **52**

Figura 13 - Gráfico representativo dos diversos municípios do Estado de São Paulo e de outros Estados que o NAP-IAL recebe amostras..... **53**

Figura 14 - Avaliação da melhor diluição dos Anticorpos Monoclonais. Caso E43929, tecido cerebral empregando-se a técnica de IHQ com anticorpo monoclonal NL nas diluições 1:1000 (A) e 1:2000 (B). Aumento 400 X..... **56**

Figura 15 - Avaliação da melhor diluição dos Anticorpos Monoclonais. Caso E43929, tecido cerebral empregando-se a técnica de IHQ com anticorpo monoclonal NM nas diluições 1:2 (A) e 1:5 (B). Aumento 400 X..... **56**

Figura 16 - Avaliação da diluição 1:10 dos anticorpo NL e NM. Caso E44423 empregando-se a técnica de IHQ no tecido cerebral. Anticorpos policlonal (A e B) contra *N. meningitidis* diluição 1:10000 e anticorpos monoclonais NL (C) e NM (D).

Aumento 400 X..... **57**

Figura 17 - Comparação de dois cromógenos diferentes, no tecido cerebral, empregando-se a técnica de IHQ no caso E45261, utilizando o anticorpo monoclonal NL 1:2000, com colorações diferentes - rósea - fosfatase alcalina + fast red (A) e marrom - peroxidase + DAB (B). Aumento 400 X..... **58**

Figura 18 - Utilização dos anticorpos monoclonais em tecido cerebral no caso E37861, com diagnóstico de rubéola. O resultado foi negativo, não houve marcação utilizando anticorpos monoclonais NL 1:1000 (A) e 1:2000 (B) e NM 1:2 (C) e 1:5 (D) empregando-se a técnica de IHQ com o cromógeno Fast Red. Aumento 400 X..... **59**

Figura 19 - Análise do caso E47434 pela coloração de Hematoxilina-eosina na meninge (A) e coloração de Gram nos vasos (B). Aumento 400 X..... **65**

Figura 20 - Análise do caso E47434 empregando-se a técnica de IHQ utilizando anticorpos policlonal contra *N. meningitidis* (A), monoclonais NL (B) e NM (C) com o uso do cromógeno Fast Red. Aumento 400 X..... **65**

Figura 21 - Análise do caso E47434 empregando-se a técnica de IHQ utilizando anticorpos policlonal contra *N. meningitidis* (A), monoclonais NL (B) e NM (C) com o uso do cromógeno DAB, que resulta em uma marcação marrom. Aumento 400 X..... **65**

Figura 22 - Análise da reação IHQ no cérebro do caso E47699 comparando os anticorpos NL (A) e NM (B) utilizando o cromógeno Fast Red e NL (C) e NM (D) utilizando o cromógeno DAB. Aumento 400 X..... **67**

Figura 23 - Análise da reação de IHQ no pulmão do caso E47699 utilizando os anticorpos monoclonais NL 1:2000 (A) e NM 1:5 (B) utilizando o cromógeno Fast Red, que resulta em uma marcação rósea. Aumento 400 X..... **67**

Figura 24 - Análise da Coloração de Gram no caso E47699 positivo para *N. meningitidis*, realizado no cérebro (A) e no pulmão (B). Aumento 400 X..... **68**

Figura 25 - Análise da reação IHQ no cérebro do caso E47149 utilizando os anticorpos NL (A) e NM (B) com o cromógeno Fast Red. Aumento 400 X..... **70**

Figura 26 - Análise do caso controle E45054 positivo para *Haemophilus influenzae* – coloração H&E (A) e anticorpos policlonal (B), NL (C) e NM (D), o qual não observou-se marcações utilizando o cromógeno Fast Red. Aumento 400 X..... **71**

Figura 27 - Análise do caso controle E44614 positivo para Influenza A - utilizando anticorpo policlonal contra *N. meningitidis* (A), e os dois anticorpos monoclonais NL (B) e NM (C), o qual não observou-se marcações utilizando o cromógeno DAB, empregando-se a técnica de IHQ. Aumento 400 X..... **72**

Figura 28 - Análise do caso controle E44782 positivo para Dengue - os dois anticorpos monoclonais NL (A) e NM (B), utilizando o cromógeno DAB, empregando-se a técnica de IHQ. Aumento 400 X..... **72**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos policlonais e monoclonais utilizados na reação de IHQ para a Padronização..... **45**

Tabela 2 - Avaliação comparativa da metodologia de PCR, anticorpos monoclonais NL e NM, e anticorpos policlonais para os diferentes patógenos analisados, em amostras de cérebro de óbitos do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz..... **55**

Tabela 3 - Reatividade dos anticorpos monoclonais NL e NM contra *N. meningitidis* no ensaio imuno-histoquímico para cada caso selecionado..... **61**

Tabela 4 - Análise do predomínio celular das meningites bacteriana e viral, baseados na literatura de Fochesatto, 2013..... **63**

Tabela 5 - Análise do predomínio celular dos casos selecionados do levantamento feito no NAP-IAL..... **63**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo – Anticorpos monoclonais

CO_2 – Gás Carbônico

CTC-IAL – Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo

DAB – 3,3-diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay, teste imunoenzimático

HAT – Hipoxantina, aminopterina e timidina

H&E – Hematoxilina-eosina

Hib – *Haemophilus influenzae* do tipo b

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IHQ – Imuno-histoquímica

IL-1 – Interleucina do tipo 1

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LPS – Lipopolissacarídeo

Men – Anticorpo policlonal anti-*Neisseria meningitidis*

mg – miligrama

mL – Mililitro

NAP-IAL – Núcleo de Anatomia patológica do Instituto Adolfo Lutz

NIT – Núcleo de Inovação Tecnológica

NL – Anticorpo monoclonal do estudo

NM – Anticorpo monoclonal do estudo

OMV – Outer membrane vesicles

PBS – Phosphate-buffered saline, solução salina tamponada com fosfatos

PCR – Polymerase chain reaction, reação em cadeia da polimerase

PME – Proteínas de membrana externa

Por A – Porina A

Por B – Porina B

SIGH – Sistema de Informação e Gestão Hospitalar

Tfp – Pili tipo IV

TNF-α – Fator de necrose tumoral do tipo α

°C – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **18**

1.1 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA MENINGOCÓCICA **19**

1.2 MECANISMO DE COLONIZAÇÃO DA BACTÉRIA NO TECIDO CEREBRAL **20**

1.3 FATORES DE RISCO **23**

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL **23**

1.5 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DE MENINGITES BACTERIANA, VIRAL E FÚNGICA **25**

1.6 COMPORTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO NO MUNDO, NO BRASIL E NO ESTADO DE SÃO PAULO **27**

1.7 ANTICORPOS **33**

1.8 ANTICORPOS MONOCLONAIS **36**

1.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO DA MENINGITE **38**

2 OBJETIVOS **40**

2.1 OBJETIVO GERAL **40**

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **40**

3 MATERIAL E MÉTODOS **41**

3.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS **41**

3.2 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS **41**

3.3 EXPANSÃO CELULAR E PRODUÇÃO DO FLUÍDO ASCÍTICO **42**

3.4 LEVANTAMENTO DE DADOS PELA PLATAFORMA SIGH **42**

3.5 OBTENÇÃO DAS LÂMINAS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IHQ **43**

3.6 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA **44**

3.6.1. Padronização dos Anticorpos Monoclonais NL e NM *44*

3.6.2 Utilização dos Anticorpos Monoclonais NL e NM na Técnica de Imuno-histoquímica *46*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **48**

5 CONCLUSÃO **74**

REFERÊNCIAS* **75**

ANEXOS **80**

A - APROVAÇÃO DO CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ 80

B – APLICABILIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-NEISSERRIA MENINGITIDIS EM IMUNO-HISTOQUÍMICA 81

C – APROVAÇÃO DA COMUNICAÇÃO BREVE PELO CORPO EDITORIAL DA REVISTA DO INTITUTO ADOLFO LUTZ 82

1 INTRODUÇÃO

Meningite é um grupo de doenças infecciosas que constituem um problema global sério à saúde, tendo uma grande relevância social pelas altas taxas de mortalidade que esta doença pode causar, mais de 500.000 casos de doença meningocócica ocorrem a cada ano, principalmente nos países em desenvolvimento (SOUZA et al., 2012).

A etiologia e a epidemiologia das meningites vêm sendo estudadas há muitos anos, com isso, tem-se a necessidade de se desenvolver estratégias preventivas efetivas contra esta doença. A frequência de endemias e epidemias que se têm no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, continua tendo um considerável impacto econômico para os países (CHANG et al., 2012).

Nos países em desenvolvimento, as meningites caracterizam um grave problema de saúde pública, devido a sua alta frequência, alta mortalidade, e muitas vezes, o surgimento de sequelas irreversíveis aos pacientes que a acometem. De acordo com esse panorama, há necessidade de um profundo conhecimento da fisiopatologia das meningites, seja bacteriana ou viral, para a identificação dos sinais e sintomas precoces que auxiliam em um diagnóstico preciso e tratamento imediato (HARRISON, 2009).

Meningite é o nome que se dá quando corre uma inflamação das meninges, membrana que recobre o sistema nervoso central. A meningite é uma doença grave, potencialmente fatal, que pode ser causada por diferentes agentes etiológicos, como bactérias, vírus e fungos, sendo as crianças menores de 5 anos as mais susceptíveis à infecção (PINHEIRO, 2016).

As meningites infecciosas estão no grupo de notificação compulsória, por sua capacidade de produzir surtos, e exigem uma vigilância epidemiológica ativa para propor ações preventivas e corretivas (CHANG et al., 2012).

As meningites virais podem ser causadas por diversos vírus e apresentam ser menos agressivas que as meningites bacterianas, com taxa de mortalidade bem mais baixa no país e na maioria dos casos, sem a necessidade de um tratamento específico (PINHEIRO, 2016).

A meningite bacteriana é comum no Brasil e é causada principalmente pela bactéria *Neisseria meningitidis*. O patógeno é estritamente humano encontrado no trato

respiratório de indivíduos saudáveis sendo transmitida por meio do contato de pessoas sadias com secreções nasofaríngeas de pessoas portadoras assintomáticas. Podem causar doença focal, como a pneumonia e a artrite, ou até mesmo resultar em quadros de septicemia fulminantes, com evolução fatal em poucas horas, denominado de meningococcemia, a sua forma mais grave (CDC, 2015).

1.1 Características do Agente Etiológico da Doença Meningocócica

A *Neisseria meningitidis* é um diplococo gram-negativo, aeróbio, imóvel, que de acordo com a sua composição antigênica da sua cápsula polissacarídica, é classificada em sorogrupos distintos. Entre os 12 sorogrupos, os principais são A, B, C, W, X e Y que causam a doença invasiva e, portanto, as epidemias (HARRISON et al., 2013). Algumas cepas que são encontradas na nasofaringe são assintomáticos, não têm cápsula e não são agrupáveis nos sorogrupos (CDC, 2015).

A cápsula polissacarídica dos principais sorogrupos associados à doença invasiva, exceto do sorogrupo A, são compostas por ácido siálico, este responsável pela proteção da bactéria contra o sistema imune do hospedeiro, e a cápsula polissacarídica do sorogrupo A composta por N-acetil-manosamina-1-fosfato (ROSENSTEIN et al., 2001).

O polissacarídeo do sorogrupo B é fracamente imunogênico em humanos, por esse motivo, as vacinas para este sorogrupo não podem ser baseadas na cápsula polissacarídica da bactéria. O desenvolvimento de uma vacina contra o sorogrupo B enfrenta um problema devido à similaridade entre a estrutura capsular do polissacáride B e o ácido polisiálico contendo glicopeptídeos que faz parte do tecido cerebral humano, podendo levar à autoimunidade. Por isso, os estudos atuais são direcionados para a pesquisa de antígenos vacinais derivados da membrana externa do meningococo (GASPARINI et al., 2014).

Além dos sorogrupos, podem ser subdivididos em sorotipos e sorosubtipos, outra classificação com base nos antígenos de proteínas de membrana externa (PME) da superfície da célula da bactéria, regiões variáveis das proteínas porina A (Por A) e porina B (Por B). Os sorotipos estão relacionados ao Por B, classe 2 e 3 da PME e os

sorosubtipos pela Por A, classe 1 da proteínas de membrana externa (ROSENSTEIN et al., 2001).

Esta bactéria possui também proteínas filamentosas denominada *pili* (fímbrias). São estruturas que se encontram na parede celular da bactéria e são responsáveis pela adesão da bactéria à célula hospedeira. As hastes do *pili* são conservadas, porém o que irá mudar são os aminoácidos nas pontas dos *pili*, determinando a especificidade de ligação de cada bactéria. Por meio de suas fímbrias e de PME, a *N. meningitidis* adere-se aos receptores específicos da mucosa, vence a primeira barreira de defesa local e cai na corrente sanguínea (KUMAR et al., 2013).

Os meningococos são transmitidos por aerossóis ou secreções da nasofaringe de indivíduos colonizados para outros. Essas bactérias superam as defesas do hospedeiro, colonizam as células da mucosa colunar não ciliada da nasofaringe e se multiplicam (TZENG; STEPHENS, 2000). Menos de 1% dessas bactérias que colonizam vão atravessar as células da mucosa e entrar na corrente sanguínea, provocando doença sistêmica. Quando isso ocorre, os meningococos se espalham no organismo pelo sangue e podem atingir vários órgãos (ROSENSTEIN et al., 2001).

1.2 Mecanismo de Colonização da Bactéria no Tecido Cerebral

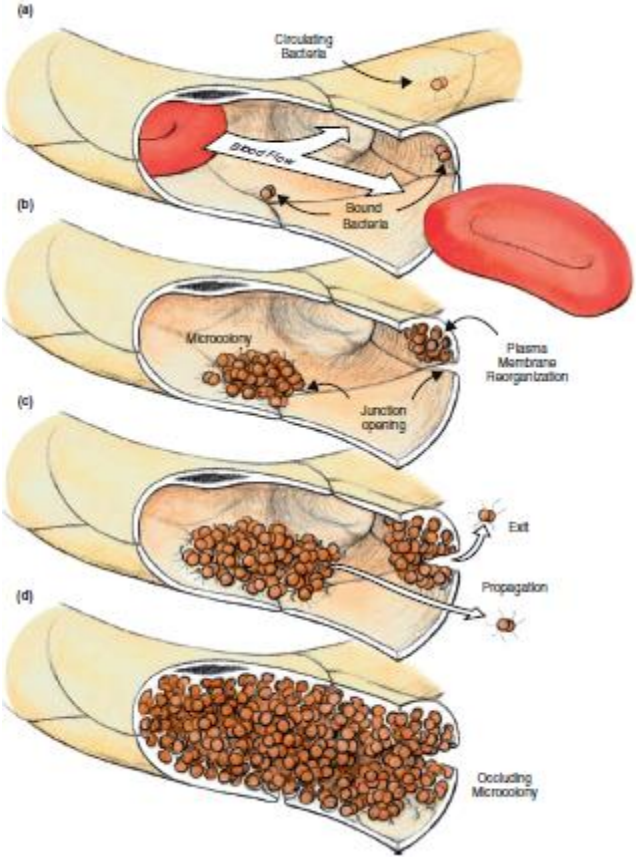
A descrição da progressão da doença, do agente causador e dos sintomas está bem estabelecida, no entanto, as fases iniciais da doença e todo o processo de infecção ainda não são compreendidos. O entendimento da infecção se torna prejudicada, devido a *N. meningitidis* ser um patógeno exclusivo do ser humano, o que dificulta a capacidade de reproduzir em animais para entender e esclarecer todo o processo de infecção no humano (MELICAN; DUMENIL, 2012).

Alguns estudos vêm determinando os componentes bacterianos que estariam envolvidos na resistência ao sistema imune do hospedeiro, incluindo as cápsulas polissacarídeas. Os exames histológicos *post-mortem* fornecem informações valiosas sobre os estágios finais da infecção, mostrando agregados bacterianos nos endotélios ao longo do corpo. As células endoteliais alinham todos os vasos sanguíneos, formando uma barreira física. E não só isso, o endotélio funciona como regulador, monitorando

todo o metabolismo do ambiente e auxiliando no fluxo sanguíneo dentro dos vasos (MELICAN; DUMENIL, 2012).

Após a multiplicação de bactérias na nasofaringe do hospedeiro, como visto na figura 1, há a translocação da *N. meningitidis* para a corrente sanguínea e provavelmente, um número ainda menor sobrevive ao sistema imune inato. Curiosamente, as bactérias têm preferência pela aderência aos capilares sanguíneos. Sabe-se que *N. meningitidis* adere-se as células por meio da pili tipo IV (Tfp). Esta estrutura interage entre a bactéria e a adesão ao endotélio (MELICAN; DUMENIL, 2012).

Figura 1- Modelo de colonização ao longo dos vasos sanguíneos pela bactéria *N. meningitidis.*



Legenda: (a) Início da adesão. (b) Proliferação. (c) Saída e propagação. (d) Oclusão dos vasos.

Fonte: Melican, Dumenil, 2012.

Uma vez em contato com a célula hospedeira, *N. meningitidis* começa a proliferar-se, formando grandes agregados ao longo da parede vascular, chamados de

microcolônias. Acompanhando esta proliferação, uma reorganização da membrana da célula do hospedeiro ajuda as microcolônias de *N. meningitidis* a resistir o aumento da tensão de cisalhamento (pressão que o sangue exerce na parede dos vasos sanguíneos). A fixação da bactéria a células do hospedeiro por intermédio da pili tipo IV induz a formação de uma placa cortical, com o auxílio de algumas proteínas como actina (MELICAN; DUMENIL, 2012).

Independente de como é anatomicamente a barreira hematoencefálica, a bactéria terá que sair da luz do vaso sanguíneo. Ao se ligar as células do hospedeiro, *N. meningitidis* recruta uma série de proteínas das células endoteliais envolvidas na formação e estabilização da aderência. Com isso, as junções celulares do vaso sanguíneo ficam enfraquecidas e como consequência, tem-se a abertura dessas junções. Ocorre o desprendimento de um número pequeno de bactérias das microcolônias e estas então atravessam a barreira hematoencefálica (MELICAN; DUMENIL, 2012).

A interação das bactérias com o endotélio do hospedeiro leva a uma desestabilização das junções endoteliais, facilitando a saída da bactéria da luz do vaso e permitindo o acesso bacteriano ao líquido cefalorraquidiano. Este é um ambiente estéril, meio rico, desprovido de muitos componentes do sistema imunológico, e um ambiente favorável para a proliferação bacteriana, conduzindo a um crescimento irrestrito de bactérias e a uma inflamação do cérebro (MELICAN; DUMENIL, 2012).

O plexo coróide também é um potencial sítio de entrada dos meningococos no líquido cefalorraquidiano. Citocinas inflamatórias, como interleucina do tipo 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral do tipo α (TNF-α), são liberadas em uma bacteremia meningocócica, podendo aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica e permitir a entrada dos meningococos (TZENG; STEPHENS, 2000). Sabe-se que indivíduos com bacteremia, em cerca de 50% deles, a bactéria pode atravessar a barreira hematoencefálica, sendo encontradas no líquido cefalorraquidiano (LCR). No espaço sub-aracnoide, reinicia um processo inflamatório com a liberação da sua toxina lipopolissacarídea (LPS) e acontece uma reação dos mediadores químicos locais (citocinas), causando a meningite (CDC, 2015).

1.3 Fatores de Risco

Os fatores de risco para a doença meningocócica envolvem uma interação de virulência microbiana, a resposta do hospedeiro frente aos agentes infecciosos e as condições do ambiente, favorecendo a exposição do meningococo (ROSENSTEIN et al., 2001).

Um fator importante na virulência do organismo é a cápsula polissacarídica, que fornece proteção contra a dessecação do organismo durante a transmissão e auxilia na evasão de mecanismos imunes ao hospedeiro. Além disso, os fatores de aquisição de nutrientes, especialmente mecanismos de aquisição do ferro; as adesinas, como a pili; proteínas de membrana externa e a liberação de vesículas de membrana externa, com componentes que são determinantes da virulência do meningococo. Estes também sofrem autólise e com isso liberam os componentes que contém informações genéticas (DNA) e de parede celular para o meio externo, ocasionando e induzindo a cascata inflamatória (ROSENSTEIN et al., 2001).

Entre os fatores do hospedeiro têm-se aglomerações e contato muito próximo que resultam em um aumento da transmissão de *N. meningitidis* e um aumento das taxas de doença invasiva. Migração e viagens também desempenham um papel importante no aumento da incidência. Podemos citar outros fatores, como aglomerações familiares, tabagismo ativo ou passivo, fatores de risco genéticos e também se o indivíduo tem infecções antecedentes, como doenças respiratórias virais, causados por influenza humana e micoplasma (TZENG; STEPHENS, 2000).

1.4 Manifestações Clínicas e Diagnóstico Laboratorial

A meningite é a apresentação mais comum da doença meningocócica invasiva, com um período de incubação da doença de 3 a 4 dias, com um espectro que pode variar de 2 a 10 dias (CDC, 2015).

As formas clínicas mais freqüentes são: meningococcemia sem meningite que atinge de 5% a 20% das infecções meningocócicas invasivas, ocasionando elevada

letalidade com a sua forma mais grave; e meningococcemia com meningite (CDC, 2015).

O diagnóstico de meningite pode parecer relativamente simples em pacientes com características clássicas de febre, dor de cabeça, rigidez do pescoço e estado mental alterado, e em casos de septicemia meningocócica, muitas vezes acompanhada de erupção petequial ou purpúrica, náuseas, vômitos, fotofobia, confusão mental, hipotensão, choque, hemorragia aguda de supra-renal e falência múltipla dos órgãos. Porém em muitos pacientes, alguns desses sinais e sintomas estarão ausentes (MCGILL et al., 2016).

A doença meningocócica pode causar sequelas em cerca de 15% dos indivíduos acometidos, além do risco de morte. Entre as sequelas da doença estão surdez, hidrocefalia, retardo mental, insuficiência renal, cicatrizes, abscessos e até mesmo amputação de membros (MCGILL et al., 2016).

Deve-se levar em conta a combinação dos sinais e sintomas para o diagnóstico da meningite por bactérias, pois pode-se confundir com as meningites virais. A idade dos indivíduos também será um determinante que auxiliará na identificação da doença (MCGILL et al., 2016).

Como as características clínicas muitas vezes não são claras, a preocupação tanto do médico quanto do parente do paciente deve sempre ser levado a sério. Os atrasos no diagnóstico e tratamento podem ter consequências desastrosas, o reconhecimento e tratamento imediato são essenciais. Os pacientes com doença meningocócica devem ser frequentemente monitorados por toda a equipe de saúde (MCGILL et al., 2016).

Quanto ao diagnóstico laboratorial, o “padrão ouro” do diagnóstico da doença meningocócica é a cultura bacteriana. O isolamento da bactéria *N. meningitidis* é o ideal para permitir a avaliação da sensibilidade dos antibióticos a serem administrados ao paciente. (CDC, 2015). No entanto, nem sempre pode ser realizada a cultura bacteriana quando já tenha sido administrada a terapia com antibióticos, sendo baixa a sensibilidade da cultura neste caso (SACCHI et al., 2011).

A coloração de Gram é um método relativamente simples que nos mostra a morfologia da bactéria, os diplococos gram-negativos de *N. meningitidis*, sugerindo fortemente a meningite meningocócica. Entretanto, dependendo da intensidade da infecção, será baixa a sensibilidade desta coloração, por não conseguir distinguir os diplococos ao exame microscópico (CDC, 2015).

Há no mercado kits para detectar antígenos no líquido cefalorraquidiano, um método rápido, fácil e específico, mas os resultados falso-negativos podem aparecer inclusive na doença meningocócica do sorogrupo B, no qual há imunidade cruzada com antígenos humanos (CDC, 2015).

Com isso, métodos alternativos para o diagnóstico foram introduzidos, como a PCR – Reação em cadeia de polimerase e detecção por antígeno por meio de métodos de aglutinação de látex, implantados no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (SACCHI et al., 2011).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para *N. meningitidis* foi utilizada nos Estados Unidos, de acordo com o trabalho publicado por Guarner e seus colaboradores (GUARNER et al., 2004). Este menciona a correlação entre a IHQ, que permite a detecção das bactérias, e a PCR, técnicas que nos permitem uma melhor compreensão da doença meningocócica. Além disso, este trabalho também aborda a correlação entre anticorpos policlonais e monoclonais sorogrupo específico, utilizando a técnica de IHQ. O protocolo da IHQ utilizado por eles é bem semelhante ao utilizado no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

1.5 Caracterização Clínica e Diagnósticos Laboratoriais de Meningites Bacteriana, Viral e Fúngica

As meningites bacterianas podem ser causadas por uma grande variedade de bactérias. A prevalência de cada bactéria está associada a um grupo de fatores – idade do paciente, porta de entrada do patógeno, estado imunitário do paciente, situação epidemiológica do local, entre outros (BRASIL, 2014).

Os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana são: *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae.* Outras bactérias também podem causar meningite, porém o modo de transmissão entre elas é o mesmo, por meio das vias respiratórias, de pessoa a pessoa, por gotículas e secreções da nasofaringe (PINHEIRO, 2016).

O quadro clínico é grave e caracterizam-se por cefaléia, náuseas, vômitos, febre, erupção cutânea, rigidez de nuca, confusão mental, podendo agravar-se para um coma e óbito. Pode haver algumas complicações no caso, como retardo mental, perda de

audição, distúrbios de linguagem, anormalidade motora e distúrbios visuais (BRASIL, 2014).

Como colocado no item anterior, os exames para diagnóstico das meningites bacterianas são – cultura bacteriana, que é o padrão ouro (sangue, líquido cefalorraquidiano ou fezes), reação em cadeia da polimerase – PCR (soro, líquido cefalorraquidiano e outras amostras), aglutinação pelo látex (soro, líquido cefalorraquidiano), contraimunoeletroforese (soro, líquido cefalorraquidiano) e exame quimiocitológico do líquor (BRASIL, 2014).

No entanto, as meningites não são apenas causadas pelas bactérias, temos alguns vírus, fungos e parasitas que podem causar a meningite, um processo inflamatório das membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal (VARELLA, 2015).

As meningites de etiologia viral têm como reservatório principal o homem, bem como as meningites bacterianas, com períodos de incubação do vírus entre 7 a 14 dias, podendo chegar até 25 dias de incubação no homem. A transmissão desta meningite ocorre por via fecal-oral, ocorrendo também pela via respiratória (BRASIL, 2014).

As manifestações clínicas mais freqüentes são: febre, mal-estar, náuseas, dor abdominal na fase inicial, seguida após 2 dias dos sintomas, de sinais de irritação meníngea, rigidez de nuca e vômitos. A duração do quadro clínico do paciente geralmente é inferior a uma semana. Estes sinais e sintomas são clássicos e confundem com os sintomas das meningites bacterianas, sendo imprescindível o diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2014).

Para o esclarecimento do diagnóstico das meningites virais, os principais exames são: isolamento viral em cultura celular (líquor e fezes); sorologia – pesquisa dos anticorpos IgG e IgM (soro); reação em cadeia da polimerase – PCR (soro, líquido cefalorraquidiano e outras amostras) e exame quimiocitológico do líquor. O aspecto do líquor nos processos inflamatórios permanece incolor, devido à baixa celularidade. Há alterações celulares e bioquímicas, com o aumento do número de leucócitos, no entanto, alteram muito pouco macroscopicamente o aspecto do líquor (BRASIL, 2014).

As meningites virais possuem uma distribuição universal, podendo ocorrer surtos e alguns casos isolados, principalmente relacionados aos enterovírus. O aumento dos casos pode estar relacionado a epidemias de caxumba, sarampo e varicela (BRASIL, 2014).

Há meningites por outros agentes etiológicos, entre eles, os fungos do gênero *Cryptococcus*, alguns protozoários e helmintos, que também podem ocasionar meningite (PINHEIRO, 2016).

A transmissão ocorre devido à inalação dos fungos do ambiente, provocando o surgimentos de sinais e sintomas que podem variar de 2 dias a 18 meses ou mais. As manifestações clínicas das meningites por fungos, principalmente pelo gênero *Cryptococcus*, apresentam-se como meningite ou meningoencefalite aguda, com algumas lesões focais no sistema nervoso central, associadas ou não a quadros meníngeos. Essas manifestações variam de acordo com o estado imunológico do paciente, podendo apresentar quadros mais agudos de meningoencefalite, com evolução para um coma (BRASIL, 2014).

1.6 Comportamento Epidemiológico no Mundo, no Brasil e no Estado de São Paulo

Meningite bacteriana tem grande relevância social devido à sua capacidade de produzir sequelas e causar a morte. No Brasil, a *Neisseria meningitidis* é a principal bactéria causadora de meningite, seguida por *Streptococcus pneumoniae*. O *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib) ocupava o segundo lugar, mas após a introdução da vacina conjugada contra a Hib em 1999, houve uma queda de 90% desta meningite, o que evidencia o valor das ações de prevenção como a imunização. O bom prognóstico da doença está baseado em diagnóstico e tratamento precoces e, portanto, o conhecimento da doença, da etiologia e de técnicas desenvolvidas de análise são decisivos. Medidas como uso de vacinas e quimioprofilaxia são importantes ferramentas no controle desta doença e suas sequelas (CHANG et al., 2012).

A meningite ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, onde a desnutrição e as condições de vida insalubre contribuem para o aumento da carga de bactérias nas doenças infecciosas. A bactéria *N. meningitidis* é uma das principais causas de meningites e de outras infecções graves em todo o mundo (CDC, 2015).

A meningite meningocócica atinge todas as classes sociais, porém sua intensidade varia de acordo com os diferentes estados socioeconômicos da população. A taxa de mortalidade de meningite bacteriana adquirida na comunidade é elevada, cerca de 20%. Embora a meningite seja contagiosa e exija a presença do agente causador da doença, é

relevante tomar as condições de vida da população para a avaliação desta doença, uma vez que resulta de uma combinação de múltiplos fatores, incluindo os fatores sociais (MCGILL et al., 2016).

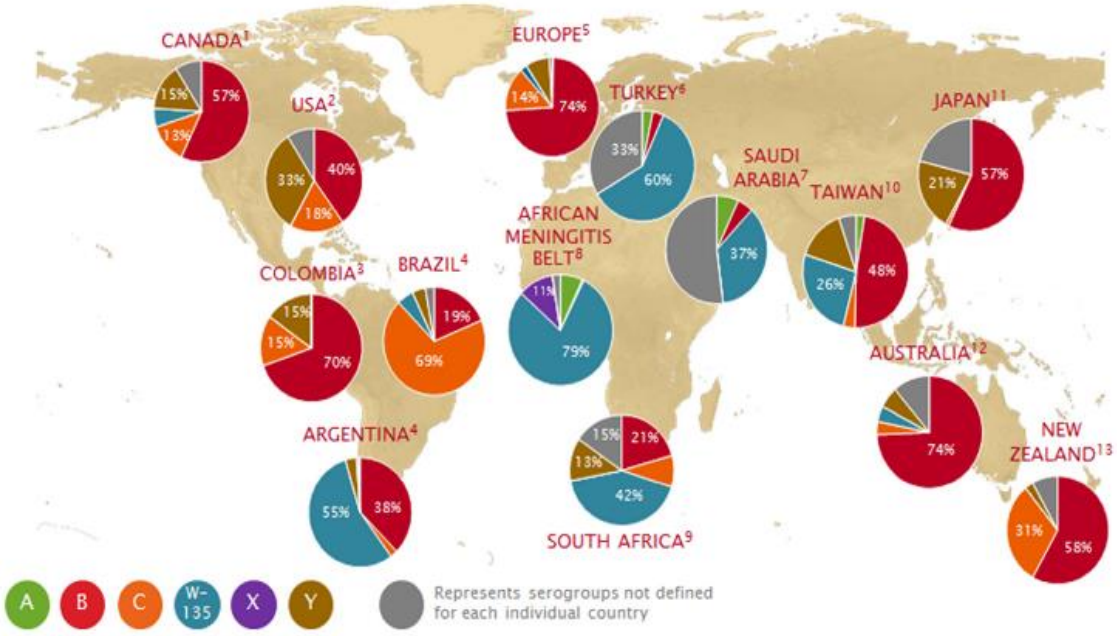
A doença meningocócica ocorre durante todo o ano, principalmente durante o inverno e início da primavera. As taxas de incidência da doença são mais altas nas crianças menores de 5 anos, no qual os anticorpos que os protegem ainda não se desenvolveram. As taxas caem depois da infância e voltam a aumentar na adolescência e adultos jovens, com idades entre 16 e 25 anos (ROSENSTEIN et al., 2001).

Nos Estados Unidos, 28% das pessoas afetadas pela doença tinham idade entre 12 a 29 anos no período de 1992 a 1996, e os casos vêm aumentando nos últimos anos entre os adolescentes e adultos jovens (ROSENSTEIN et al., 2001). Um estudo recente realizado no período de 2006 a 2012 verificou uma baixa incidência da doença meningocócica, com as taxas de 0,15 por 100.000 habitantes/ano. No entanto, a incidência se manteve alta na infância, menores de 1 ano, causados pelo sorogrupo B (MACNEIL et al., 2015).

Um estudo na Inglaterra e País de Gales mostraram um aumento na incidência de meningite em adultos entre 2004 e 2011, com o maior aumento em maiores de 65 anos. A incidência anual em adultos é estimada em 1,05 casos por 100.000 habitantes, com maior incidência no grupo de 45 a 64 anos (1,21 por 100.000) (OKIKE et al., 2014).

A figura 2 mostra um panorama mundial dos sorogrupos. A distribuição dos sorogrupos varia geograficamente e temporalmente, sendo os sorogrupos A, B, C responsáveis pela maioria dos casos de doenças meningocócicas em todo o mundo. Sorogrupos B e C são prevalentes na Europa e nas Américas e os sorogrupos A e C na Ásia e na África (ROSENSTEIN et al., 2001).

Figura 2 – Visão global dos sorogrupos de *N. meningitidis.*



Legenda: Sorogrupos A, B, C, W-135, X, Y e sorogrupos representantes não definidos para cada país.
Fonte: Orta et al, 2015.

A incidência da doença meningocócica no Brasil começou a ser monitorada a partir da epidemia da década de 70, entre 1971 e 1974, o qual atingiu cerca de 170/100.000 hab/ano, causada pelos sorogrupos A e C. Na década de 80, de 1980 a 1992, houve um predomínio do sorogrupo B, responsável por aproximadamente 80% dos casos de doença meningocócica no Brasil. Em 1988, temos uma epidemia situada na grande São Paulo, ao qual foram atingidos mais de 17 milhões de habitantes em 38 municípios de São Paulo, sendo o sorogrupo B responsável por esta epidemia (MILAGRES et al., 1994).

Já a década de 90, esta foi caracterizada pelo aumento progressivo da doença causada pelo meningococo C. Atualmente, os sorogrupos B e C são predominantes no

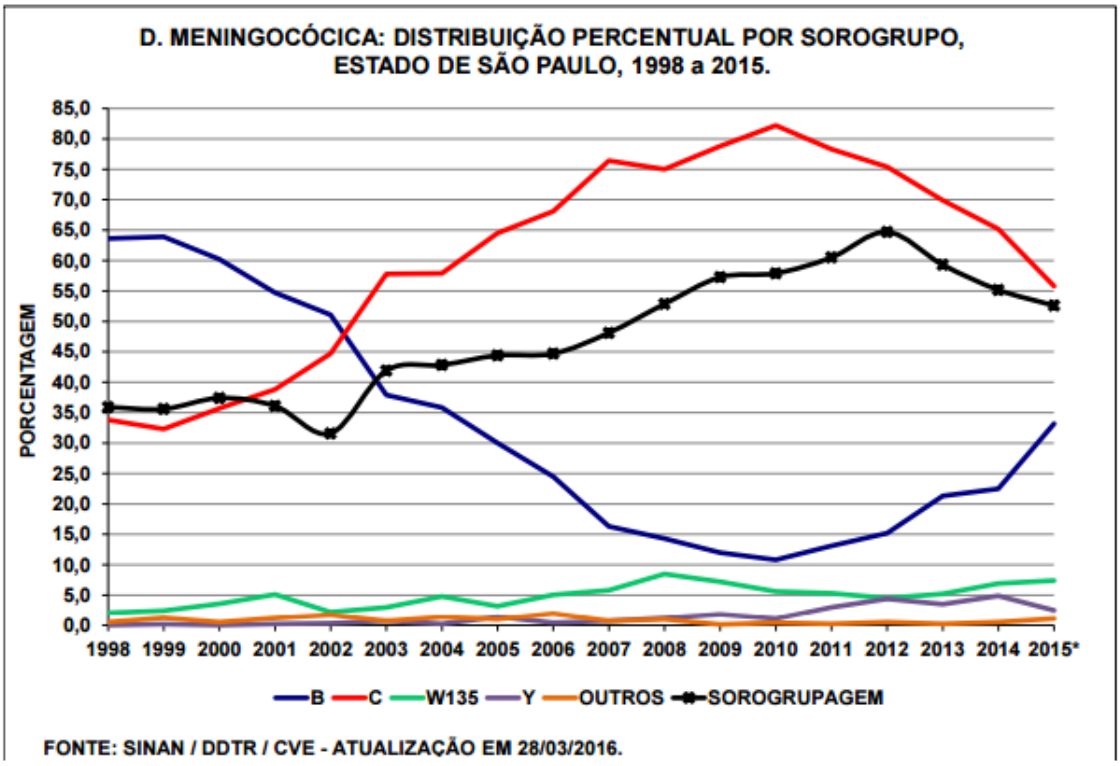
Brasil, no entanto, tem-se o sorogrupo W emergindo nos últimos anos. Em 2011, foram notificados surtos de meningite meningocócica pelo sorogrupo C no Nordeste, em Minas Gerais, São Paulo e no Rio de janeiro. A incidência média no Brasil é de 1,9/100.000 hab/ano, mas pode variar de 1,3 a 2,9 casos por 100.00 habitantes (SOUZA et al., 2012).

Atualmente, na América Latina, sorogrupos B e C são dominantes, mas aumenta a proporção de casos de doença meningocócica causada pelo sorogrupo W. Surtos do sorogrupo W vêm sendo relatados em vários países, não apenas no Brasil. Desde 1990, os casos de doença meningocócica pelo sorogrupo W foram detectados na região. No Brasil, 5,2% de isolados do sorogrupo W foram detectados, enquanto que na Venezuela nenhum. O maior aumento da prevalência do sorogrupo W foi observado na Argentina, com aumento de 6,3% em 2006 para 52% em 2012 (SAFADI et al., 2015).

Ao longo dos anos, a faixa etária atingida pelo sorogrupo W também mudou: tínhamos os indivíduos mais velhos sendo afetados pelo sorogrupo W; a partir de 2008, os indivíduos mais jovens passaram a ser atingidos por este sorogrupo (SAFADI et al., 2015).

De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE), o sorogrupo B está emergindo nos últimos 5 anos, enquanto que o sorogrupo C está caindo a sua incidência no mesmo período, porém esta ainda é alta no Estado de São Paulo, atingindo de 55% a 60%. Os sorogrupos W e Y também aparecem em São Paulo, no entanto a incidência é baixa, em torno de 5%, como observado na figura 3 (SÃO PAULO, 2016).

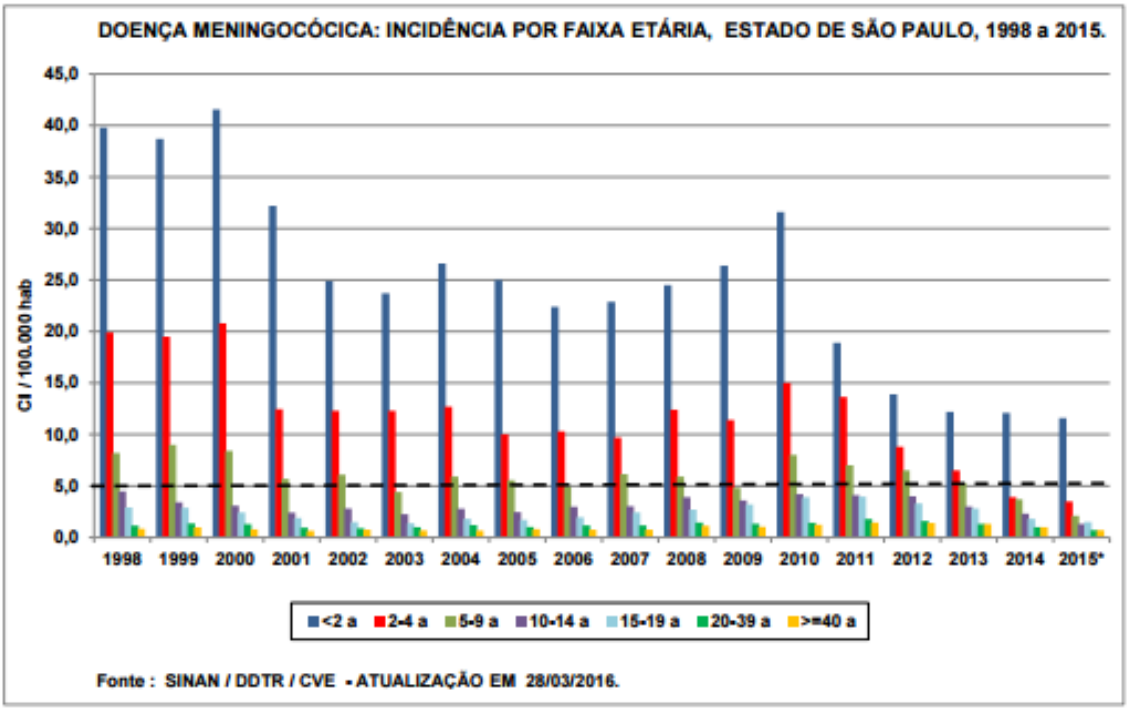
Figura 3 - Gráfico da distribuição percentual da doença meningocócica por sorogrupo no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2015.



Fonte: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica. São Paulo, 2016.

Com relação a incidência no Estado de São Paulo por faixa etária, a maior incidência sempre ocorreu em menores de 2 anos de idade, como visto na figura 4. Desde 2011 esta incidência vem caindo, como vêm diminuindo proporcionalmente nas outras faixas etárias. De 2 anos a 4 anos de idade, também têm-se uma alta na incidência, que vem diminuindo nos últimos 4 anos, ficando abaixo dos 10/100.000 hab/ano (SÃO PAULO, 2016).

Figura 4 - Gráfico da incidência da doença meningocócica por faixa etária no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2015.



Fonte: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica. São Paulo, 2016.

1.7 Anticorpos

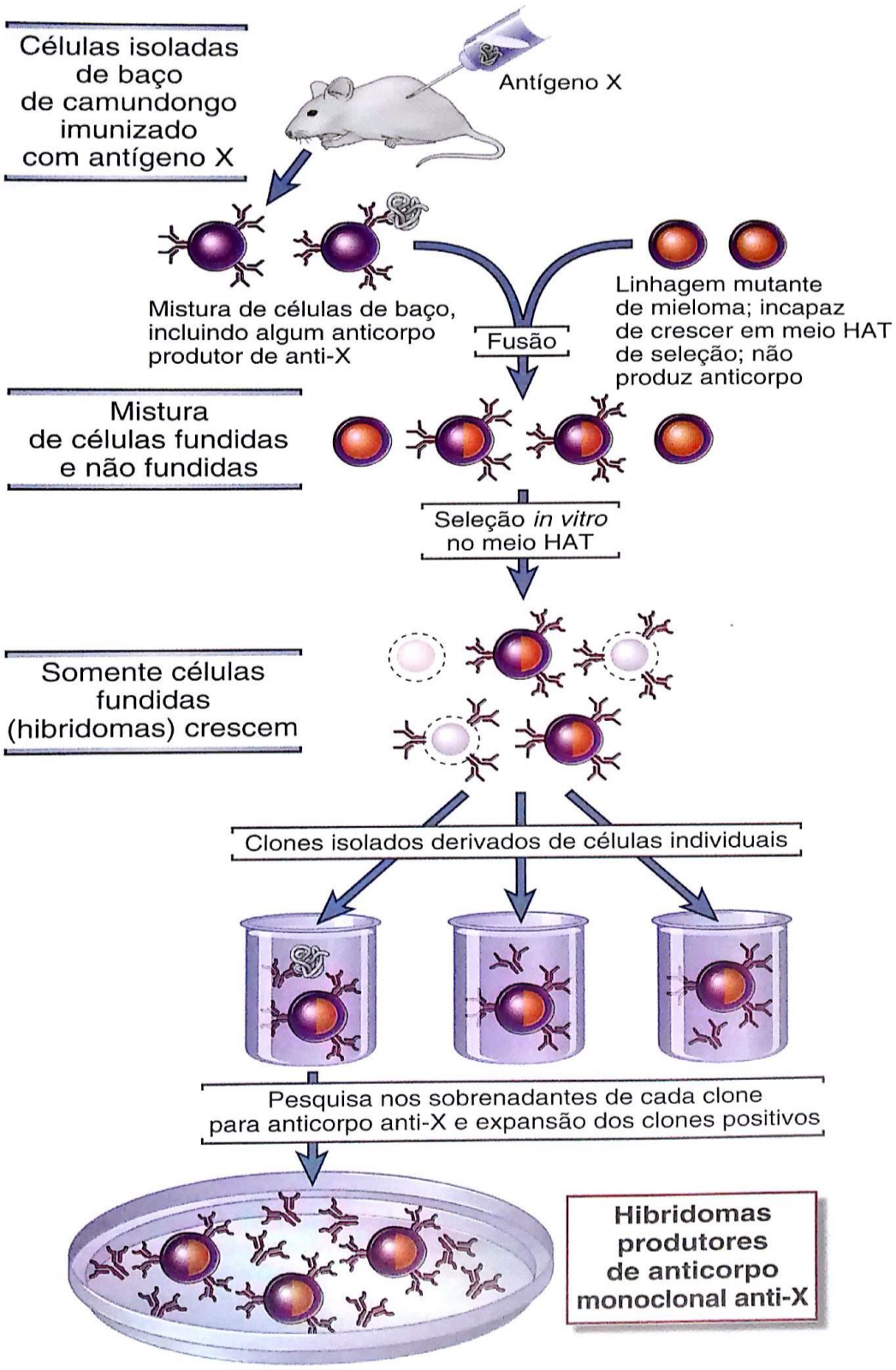
Anticorpos são proteínas circulantes que reconhecem antígenos de maneira específica e com um alto grau de afinidade. Os anticorpos são diversos e específicos, constituem os mediadores da imunidade humoral contra todas as classes de microrganismos. Dentre os anticorpos, há os policlonais e os monoclonais (ABBAS et al., 2015).

Os anticorpos policlonais são produzidos pelos linfócitos B que circulam por meio do sangue e da linfa. São responsáveis por localizar, reconhecer, detectar, ligar-se e inativar um antígeno, ou dar início ao processo de eliminação do mesmo. Podem ocorrer ligações inespecíficas, pois são imunoglobulinas direcionadas para um tipo de antígeno e epítopos diferentes (GUARNER et al., 2004).

Os anticorpos monoclonais (AcMo) surgiram da descoberta do direcionamento a um epítopo específico do antígeno, gerados em laboratório para reconhecer e se ligar a qualquer antígeno de interesse. Esse método foi descrito por César Milstein e Georges Köhler em 1975, em um artigo publicado pela revista *Nature*, e provou ser um dos avanços mais valiosos em toda a pesquisa científica e medicina clínica (KOHLER; MILSTEIN, 1975).

Na figura 5 tem-se o esquema de produção de anticorpos a partir da inoculação do antígeno de interesse em camundongos, a fusão celular, seleção dos hibridomas e expansão das células produtoras de anticorpos monoclonais.

Figura 5 - Esquema de produção de anticorpos monoclonais a partir da inoculação do antígeno em camundongo. Meio HAT: Hipoxantina, Aminopterina e Timidina



Fonte: Imunologia Celular e Molecular.Abbas, 2015.

Köhler e Milstein descreveram a técnica de produção de anticorpos monoclonais por uma linhagem de células denominada hibridomas. (KOHLER; MILSTEIN, 1975). A produção dos anticorpos monoclonais baseia-se na fusão de linfócitos B de um animal imunizado, geralmente de camundongos, com uma linhagem celular de mieloma mutante. As células mielômicas são células não secretoras de anticorpos, porém possuem alta capacidade mitótica e vida longa de cultivo, incapaz de se desenvolver em meio HAT (hypoxantina, aminopterina e timidina). As células que não fundiram não sobrevivem neste meio (ABBAS et al., 2015).

As células fusionadas são chamadas de hibridomas, células que reunirão as características genéticas de ambas as células, com alta capacidade de produzir anticorpos específicos e ser cultivadas *in vitro* indefinidamente. O sucesso da técnica está na seleção das células híbridas em meio HAT. Este meio não permite o crescimento das células que não foram fusionadas (ABBAS et al., 2015).

Os hibridomas são células derivadas de um único clone, que produzem e secretam imunoglobulinas idênticas, denominados de anticorpos monoclonais. Estes interagem específica e exclusivamente com o determinante antigênico utilizado como imunizante (ABBAS et al., 2015).

Assim, tem-se a necessidade de verificar a presença dos anticorpos de interesse no sobrenadante de cultura e então fazer a seleção da célula por diluição limitante. Portanto, o produto desses clones individuais são anticorpos monoclonais, específicos para um único epítopo do antígeno utilizado para imunizar o animal (ABBAS et al., 2015).

Com a descoberta da técnica de produção dos anticorpos monoclonais, várias áreas da imunologia e da medicina mostraram um importante avanço, com o mais favorecido deles, o Imunodiagnóstico. Os anticorpos monoclonais são extremamente específicos e possuem alta afinidade para a detecção de diversos antígenos e por isso ideais para a confecção de kits de diagnóstico para doenças infecciosas, principalmente, quando utilizados para o diagnóstico mediante os ensaios imuno-histoquímicos (GUARNER et al., 2004).

Em decorrência de sua alta especificidade e sensibilidade, as produções dos AcMo são de extrema importância na área médica, sendo uma grande inovação para a indústria biotecnológica, uma vez que estão sendo desenvolvidos para alvos específicos. Apesar

da utilização dos anticorpos monoclonais na terapêutica médica e em investigações epidemiológicas, eles podem ser muito úteis no diagnóstico em diferentes patologias (CORDEIRO et al., 2014).

1.8 Anticorpos Monoclonais

A partir da descoberta da tecnologia de obtenção dos anticorpos monoclonais e a sua introdução em diversas técnicas, tem-se melhorado muito o entendimento quanto à diversidade de imunoglobulinas, respostas primárias e secundárias, a determinação de sorotipos e subtipos dos meningococos e a compreensão quanto a mudanças na região variável de um anticorpo após um estímulo antigênico, ocorrendo um aumento na afinidade com o antígeno (MARQUES, 2005).

Desde 1975, da descoberta dos anticorpos monoclonais, os primeiros anticorpos produzidos eram murinos. Embora os anticorpos fossem produzidos naturalmente pelo sistema imunológico, houve a necessidade de anticorpos com especificidade única para serem produzidos em larga escala. Para tanto, houve a estimulação da geração de novas tecnologias para a produção em escala biofarmacêutica (MARQUES, 2005).

Com o intuito de diminuir os efeitos adversos causados pelos anticorpos murinos e com maior segurança na sua utilização, outras técnicas foram sendo desenvolvidas, como os anticorpos monoclonais quiméricos ou humanizados, os anticorpos monoclonais obtidos por biblioteca genômica, anticorpos obtidos a partir de camundongos transgênicos, sendo que atualmente esses anticorpos monoclonais estão sendo muito utilizado para o uso terapêutico (MARQUES, 2005).

Com aplicabilidade na área de *Neisseria meningitidis*, o sistema de sorotipagem para meningococos baseia-se em uma variedade de anticorpos monoclonais que reconhecem diferenças antigênicas nas proteínas de membrana externa de classe 2 ou 3 (porina B) e de classe 1 (porina A) . O sistema de tipagem com anticorpos monoclonais foram desenvolvidos por causa das dificuldades encontradas com o uso de soros policlonais hiperimunes para tipagem, como descrito em trabalhos publicados pelo nosso laboratório (BELO, 2004, 2007; CHAVES et al., 2015; DE GASPARI, ZOLLINGER, 2001; FERRAZ et al., 2008).

Depois de perceber a necessidade de métodos de subtipagem mais sensíveis quase 20 anos atrás, um projeto foi criado para desenvolver um sistema de subtipos com base

em anticorpos monoclonais pelos pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde Pública e Proteção Ambiental da Holanda. Um painel de sorotipagem e sorosubtipagem de anticorpos monoclonais já está disponível no site da Universidade de Oxford, no Reino Unido (FERRAZ et al., 2008). Além disso, tem-se disponível uma ferramenta muito importante, o site Neisseria.org, que contém informações sobre diagnóstico, tratamento, vigilância da doença meningocócica e controle da saúde pública, como uma importante base de dados atualizado sobre os anticorpos monoclonais, informações sobre o genoma e sobre as vacinas meningocócicas.

Antes que este projeto fosse realizado, a fim de padronizar a sorosubtipagem, um estudo internacional comparando sensibilidade e especificidade entre 11 laboratórios foi realizado com o uso de 85 cepas isoladas de *Neisseria meningitidis*, geograficamente e temporalmente, do sorogrupo B em 1992 (FERRAZ et al., 2008).

Esse estudo cego colaborativo descrito foi desenvolvido para estabelecer as especificidades e sensibilidades dos anticorpos monoclonais disponíveis e a variabilidade entre os laboratórios participantes. Este demonstrou que alguns anticorpos monoclonais contra OMPs, do inglês Outer Membrane Proteins, proteínas de membrana externa do meningococo (sorotipos 4, 1 e 15 e subtipos P1.6, P1.10 e P1.15) aos quais não são muito sensíveis (POOLMAN et al., 1994).

Entretanto, não invalidando a metodologia utilizada, alguns laboratórios relataram poucos resultados como fracamente positivo. A análise destes resultados, em que os fracamente positivos foram marcados, quer como positivas ou como negativas, revelou algumas diferenças não significativas em termos de sensibilidade, especialmente no que diz respeito a anticorpos monoclonais específicos de subtipo produzido (POOLMAN et al., 1994).

As maiores diferenças entre os resultados obtidos pelos vários laboratórios estavam com os anticorpos monoclonais com os menores graus de sensibilidade. A razão mais frequente para os resultados incorretos obtidos com os anticorpos monoclonais era o falso-negativo, que foi o mais relatado pelos mesmos laboratórios. Estas descobertas ilustram que várias práticas de laboratório têm uma influência sobre os resultados, e é necessária a realização correta do método de tipagem recomendado (POOLMAN et al., 1994).

Um dos problemas relatados com os métodos de sorotipagam e sorosubtipagem baseados nos AcMo por este estudo foi que uma grande proporção dos isolados eram não tipáveis. O resultado indica que a sorosubtipagem pode ser padronizado. Estudo

comparativo entre os laboratórios permitiu a identificação de anticorpos monoclonais adequados e menos adequados com relação a especificidade e sensibilidade, e dá a oportunidade para melhorar o desempenho dos anticorpos monoclonais no laboratório (POOLMAN et al., 1994).

Atualmente, o sistema de tipagem de *N. meningitidis* inclui a determinação de grupos, sorotipos e subtipos, através de técnicas como ELISA ou dot-blot ELISA usando os anticorpos monoclonais. O sorotipos, subtipos, os lipopolissacarídeos (LPS), classe 5 e especificidade de reação cruzada de AcMo são definidas pela sua reatividade com células completas ou com as proteínas da membrana externa de cepas nativas por meio da análise por imunodot (FERRAZ et al., 2008).

A determinação da triagem por métodos mais adequados e análises do subtipo depende das necessidades imediatas de uma investigação. Um painel de AcMo específicos com subtipos bem caracterizados propostas para utilização em rastreio de um grande número de isolados durante um surto deve ser selecionado para identificar a maioria das cepas. Este método de triagem epidemiológica tem se mostrado eficaz na avaliação de surtos durante os últimos 17 anos (FERRAZ et al., 2008).

1.9 Imuno-histoquímica como ferramenta no diagnóstico da Meningite

A Imuno-coloração ou Imuno-histoquímica, é uma das colorações específicas, que coram exclusivamente um determinado componente dos tecidos. Esta coloração surgiu da necessidade de identificar moléculas específicas nos tecidos para auxiliar num diagnóstico histopatológico. Esta reação consiste no uso de anticorpos selecionados para identificar antígenos específicos. É uma reação de alta sensibilidade, podendo revelar pequenas quantidades das substâncias em amostras fixadas e incluídas na lâmina (MICHALANY, 1998).

Os ensaios de imuno-histoquímica permitem a detecção de bactérias e os seus antígenos, mantendo as características morfológicas do tecido. Isto nos permite estudar os mecanismos patogênicos nas amostras de tecidos humanos (GUARNER et al., 2004).

Neste tipo de reação, é utilizado o método indireto, no qual o marcador visualizado está ligado a um anticorpo secundário que está dirigido contra um anticorpo primário e a um antígeno, amplificando então a sua reação (MICHALANY, 1998).

No presente momento, o laboratório de imuno-histoquímica do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz (NAP-IAL) emprega, para a pesquisa de antígenos de *N. meningitidis* em amostras teciduais preservadas em formol, anticorpos policlonais produzidos e gentilmente cedidos pelo Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Entretanto, pela natureza policlonal do reagente, alguns casos de infecção estreptocócica, confirmados por PCR, são por este detectado. Por esta razão, torna-se necessário desenvolver alguma estratégia para confirmação da presença do antígeno causador da infecção, principalmente na ausência de amostra adequada ao PCR.

Desde 1996 o laboratório de anticorpos monoclonais antígenos e adjuvantes do Instituto Adolfo Lutz trabalha com a caracterização antigênica de cepas de *N. meningitidis* com o painel de anticorpos monoclonais pré-estabelecido e produção de novos monoclonais para a caracterização de perfis desconhecidos (BELO, 2004, 2007; DE GASPARI, ZOLLINGER, 2001).

Com auxílio do NAP-IAL, que oferece, em sua rotina laboratorial, o diagnóstico imuno-histoquímico para doenças neoplásicas e infecto-contagiosas e, atualmente, é referência regional e nacional para os diferentes agentes infecciosos, utilizamos a técnica de IHQ com os anticorpos monoclonais para a diferenciação de meningites bacterianas e virais (BOGER et al., 2013; JAY et al., 2013).

Pretende-se, com a padronização destas reações, estabelecer um protocolo para a pesquisa IHQ de antígenos de *N. meningitidis,* e incrementar o diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não houve confirmação por técnicas biomoleculares, como o PCR, da presença do agente causador desta doença, utilizando anticorpos monoclonais para antígenos presentes em *N. meningitidis,* de diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar dois hibridomas murinos secretores de anticorpos monoclonais produzidos no laboratório de anticorpos monoclonais antígenos e adjuvantes do Instituto Adolfo Lutz, contra antígenos de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B.

2.2 Objetivos Específicos

1. Expandir os clones híbridos para a obtenção dos anticorpos monoclonais;

2. Selecionar os casos encaminhados ao Núcleo de Anatomia-Patológica do Instituto Adolfo Lutz através da Plataforma SIGH (Sistema de Informação e Gestão Hospitalar);

3. Avaliar os anticorpos monoclonais NL e NM pela reação de Imuno-histoquímica com o auxílio dos resultados do anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis* e o método de PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Plataforma Brasil em 15 de Julho de 2014 pelo número C.A.A.E: 22581214.9.0000.0059. Também foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL) em 25 de Junho de 2013, pelo número CTC17 E/2013.

3.1 Obtenção de Anticorpos monoclonais

Os AcMo utilizados foram obtidos a partir da imunização de camundongos BALB/c com amostras de antígenos de membrana externa de *N.meningitidis* B. A metodologia de produção, purificação e caracterização dos anticorpos monoclonais usados foram descritos em trabalhos prévios de nosso laboratório (BELO, 2004, 2007; CHAVES et al., 2015; DE GASPARI, ZOLLINGER, 2001; FERRAZ et al., 2008).

3.2 Reatividade dos anticorpos monoclonais

Dois dos anticorpos monoclonais obtidos estão em fase de patente no Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) do Instituto Adolfo Lutz. Os anticorpos monoclonais escolhidos para o estudo têm como característica serem de reatividade cruzada.

O anticorpo NM (sobrenadante de cultura de células) e o NL (ascite) foram submetidos em diferentes diluições para a padronização na técnica de IHQ. O anticorpo monoclonal NM está sendo usado na técnica de IHQ na diluição 1:5 e o anticorpo monoclonal NL na diluição 1:2000 no qual apresentaram uma boa especificidade após as diluições utilizadas (FERRAZ et al., 2008).

Gostaríamos de salientar que para a técnica de imuno-histoquímica os anticorpos monoclonais NL e NM estão sendo usados nesta diluição após a padronização. Entretanto o anticorpo NM é utilizado na concentração 1:1000 na técnica de ELISA e o NL a 1:10.000 quando utilizamos a reatividade homóloga para OMV, vesículas de membrana externa, “ Outer Membrane Vesicles” de *Neisseria meningitidis*.

3.3 Expansão Celular e Produção do Fluído Ascítico

Primeiramente, descongelamos os hibridomas, para fazermos a expansão das células para a produção do sobrenadante de cultura e de ascite. Os híbridos que foram positivos selecionados pela técnica de ELISA foram mantidos em cultura. Após o crescimento celular nas placas de 96 orifícios, as células foram repicadas em placas de 24 orifícios e posteriormente expandidas em frascos de 500 mL, contendo meio Iscove's. As garrafas foram incubadas a 37 °C em ambiente de CO_2 a 5% e cultivadas até que aproximassem 75% da superfície de crescimento da garrafa que estivesse coberta pelas células. Quando estas células atingiram uma densidade adequada na placa, estas células estariam prontas para a retirada do sobrenadante de cultura contendo os anticorpos, para o congelamento ou inoculação em camundongos visando a indução do fluído ascítico (RIBEIRO, 2003).

Fêmeas de camundongos BALB/c foram utilizados no estudo. Injetou-se 1 mL de óleo mineral puro via intra peritoneal, 10 dias antes de injetar as células. Centrifugou-se a suspensão dos hibridomas, sendo o "pellet" de células lavado duas vezes com 10 mL de meio Iscove's-completo, com antibióticos e antimicóticos e suplementado com soro albumina bovina. Ressuspendeu-se as células em meio Iscove's-completo e injetou $2x10^7$ de células na região intraperitoneal do camundongo para a produção de ascite. Após aproximadamente 10 dias, os camundongos começaram a produzir grande quantidade de fluídos, a ascite, muito rica nos anticorpos desejados. Este líquido ascítico foi retirado por punção estéril e armazenado a -20 °C (RIBEIRO, 2003). Tanto o fluído ascítico quanto o sobrenadante de cultura foram purificados como descrito no trabalho de De Gaspari e Zollinger (2001).

3.4 Levantamento de Dados pela Plataforma SIGH

Para o início de nosso trabalho foi feito um levantamento de dados por meio do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH), uma base de dados no qual contém os laudos emitidos de todos os exames que foram realizados com os pacientes que deram entrada no Instituto Adolfo Lutz, sendo que esta é acessada por pessoas cadastradas no SIGH.

No nosso estudo, selecionamos nessa plataforma os casos de pacientes suspeitos de meningite ou meningococcemia, que entraram no Núcleo de Anatomia Patológica do IAL, no período de 2009 a 2015, correlacionando os parâmetros de avaliação: data de entrada da amostra, idade do paciente, município, as suspeitas clínicas, o diagnóstico histopatológico e os resultados da IHQ ou de outros exames complementares. A partir deste levantamento, separamos os casos para utilizar os anticorpos monoclonais selecionados.

3.5 Obtenção das lâminas para análise histopatológica e IHQ

As amostras enviadas por hospitais, vigilância sanitária, pelo Instituto Médico Legal ou outros locais são recebidos pela triagem do Instituto Adolfo Lutz e, então, encaminhados aos setores específicos para cada amostra. Chegando ao Núcleo de Anatomia-Patológica, estas amostras ficarão no aguardo da macroscopia, processo pelo qual o médico patologista avalia o que ele está recebendo, o tipo de tecido, tamanho, cor, consistência e localização de alguma lesão, se houver, além dos fragmentos que serão colocados em um cassete de plástico. A amostra dentro do cassete fica em um recipiente com formol até o técnico colocar em um equipamento chamado histotécnico (Leica Biosystems Nussloch GmbH - Alemanha) ou processador automatizado de tecidos que compreende em banhos alternados de formol, álcool, xilol e parafina, por um período de 12 horas, preparando o tecido para a etapa seguinte (MICHALANY, 1998).

Após este período, retira estes cassetes do equipamento e coloca no autoinclusor (Leica Biosystems). A inclusão é um processo de impregnação do tecido na parafina, formando os blocos. O corte é realizado num equipamento chamado Micrótomo (Zeiss - Alemanha), no qual após o bloco passar por uma navalha, tem-se um corte fino de tecido (3 a 5 µM de espessura). Uma das lâminas feitas será submetida à coloração de hematoxilina-eosina, esta constitui a coloração básica geral, para uma análise histopatológica. As lâminas restantes serão submetidas às reações imuno-histoquímicas (MICHALANY, 1998).

3.6 Reação de Imuno-histoquímica

3.6.1. Padronização dos Anticorpos Monoclonais NL e NM

Fixados em formol, 10 amostras de tecido de cérebro foram emblocados em parafina, sendo 4 casos de *Neisseria meningitidis* confirmados por PCR; 1 caso de Febre maculosa - *Rickettsia rickettsii* confirmado pela IHQ; 4 casos de *Streptococcus pneumoniae* confirmados por PCR e 1 caso de Rubéola confirmado pela IHQ, foram selecionados de óbitos de pacientes encaminhados pelos Serviços de Vigilância Epidemiológica e recebidos pelo NAP-IAL.

As amostras foram submetidas à microtomia para obtenção de seções histológicas, seguidas pela coloração Hematoxilina e Eosina (H&E). Após análise histopatológica, foram realizados ensaios de IHQ (ALVES, 1999; SHI et al, 1999).

Em nosso estudo preliminar, foram utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais: para Febre Maculosa (*Rickettsia rickettsii),* Rubéola e *N. meningitidis.* A especificação de cada um está descrita na tabela 1.

Os reagentes utilizados para analisar estes anticorpos foram: Kit Polímero Conjugado a Peroxidase (Picture Max HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum DAB) da Life Technologies e o Kit Polímero Conjugado a Fosfatase Alcalina (Hidef) da Cell Marque.

Tabela 1 - Anticorpos policlonais e monoclonais utilizados na reação de IHQ para a Padronização.

Anticorpo	Origem	Código do Produto	Tipo	Título
Anti-Rickettsia	CDC – Atlanta EUA	Lote: ab#70	Policlonal - Coelho	1:30.000
Anti-Rubéola/ Clone: E1-20	Millipore	Lote: 19572223	Monoclonal-Camundongo	1:100
Anti-*N. meningitidis*	Serviço de Microbiologia e Imunologia – Divisão Biologia Médica do Insituto Adolfo Lutz	Lote: 41	Policlonal - Cabra	1:10.000

Legenda: Anticorpo para Febre maculosa (*Rickettsia rickettsii)*, Rubéola e Meningite (*Neisseria meningitidis*); suas origens, a partir de que animal é feito o anticorpo e a sua titulação utilizada na reação IHQ.

Para a padronização em nosso estudo preliminar, os anticorpos monoclonais foram submetidos a diluições seriadas. O anticorpo NL foi testado nas diluições 1:10, 1:1000 e 1:2000; e o anticorpo NM nas diluições 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10, ambos testados em lâminas com tecido de cérebro emblocado em parafina. Por intermédio destes testes, utilizamos para nossos estudos a diluição que melhor nos mostrou as marcações positivas dos meningococos no tecido cerebral, sem uma reação de fundo escura “background” e coloração inespecífica que nos atrapalhasse na análise dos casos. No presente estudo, os anticorpos monoclonais foram usados na reação de IHQ nas diluições 1:5 no anticorpo do sobrenadante (NM) e 1:2000 no anticorpo da ascite (NL).

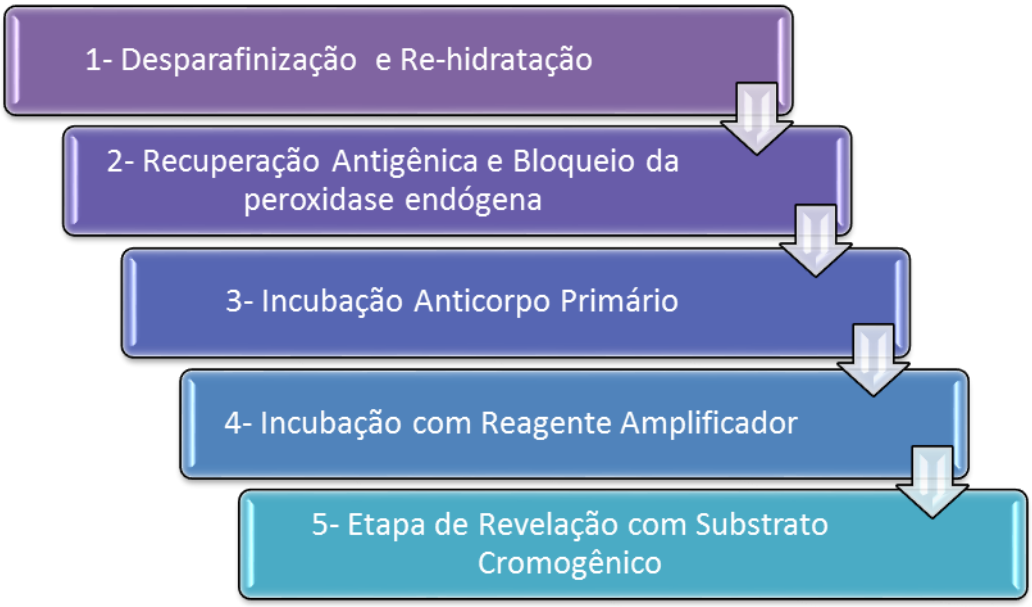
3.6.2 Utilização dos Anticorpos Monoclonais NL e NM na Técnica de Imuno-histoquímica

Amostras de necropsia de cérebro fixados em formol e emblocados em parafina foram selecionadas de pacientes encaminhados pelos Serviços de Vigilância Epidemiológica e recebidos pelo NAP-IAL. Em nosso estudo, foram escolhidos 50 amostras dentre os 320 casos que entraram no setor com suspeitas de meningite ou meningococcemia, no período de 2009 a 2015.

Os reagentes utilizados para analisar os anticorpos foram: Kit Polímero Conjugado a Peroxidase (Picture Max HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum DAB) da Life Technologies e o Kit Polímero Conjugado a Fosfatase Alcalina (Hidef) da Cell Marque.

Para as reações de imuno-histoquímica, a recuperação antigênica no tecido que estava fixada no formol ocorreu pelo processo utilizando a proteinase K na concentração de 0,1mg/ml (PILERI et al., 1997), utilizando o protocolo de reação abaixo: (ALVES, 1999; SHI et al, 1999)

Figura 6 – Fluxograma do Protocolo da Reação de Imuno-histoquímica



1- Desparafinização e Re-hidratação: desparafinização em dois banhos de xilol; re-hidratação das seções em banhos de álcool em diferentes concentrações, água corrente e destilada;

2- Recuperação Antigênica e Bloqueio da Peroxidase Endógena: recuperação antigênica, com emprego de digestão enzimática (Proteinase K, Sigma) na concentração 0,1mg/mL; lavagens em água corrente, água destilada; bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio por 20 minutos em estufa a 37 °C; lavagens em água corrente e água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS 10mM, pH 7,4);

3- Incubação Anticorpo Primário: incubação com anticorpo primário (anticorpo policlonal ou monoclonal), em diluição previamente determinada, contendo soro albumina bovina a 1% com azida sódica a 0,1% para bloqueio de ligações inespecíficas, a 4 °C em câmara úmida, por cerca de 18 horas; ao final deste período, lavagens em PBS;

4- Incubação com Reagente Amplificador: incubação com reagente amplificador (polímeros conjugados com anti-imunoglobulinas de camundongo e enzima fosfatase alcalina), a 37 °C em câmara úmida, por 30 minutos; ao final desta etapa, lavagens em PBS;

5- Etapa de Revelação com Substrato Cromogênico: etapa de revelação com o substrato cromogênico Naftol-Fast Red (reação positiva será visualizada pela coloração vermelha); e uma etapa de contra-coloração com Hematoxilina; os cortes foram desidratados e montados para análise.

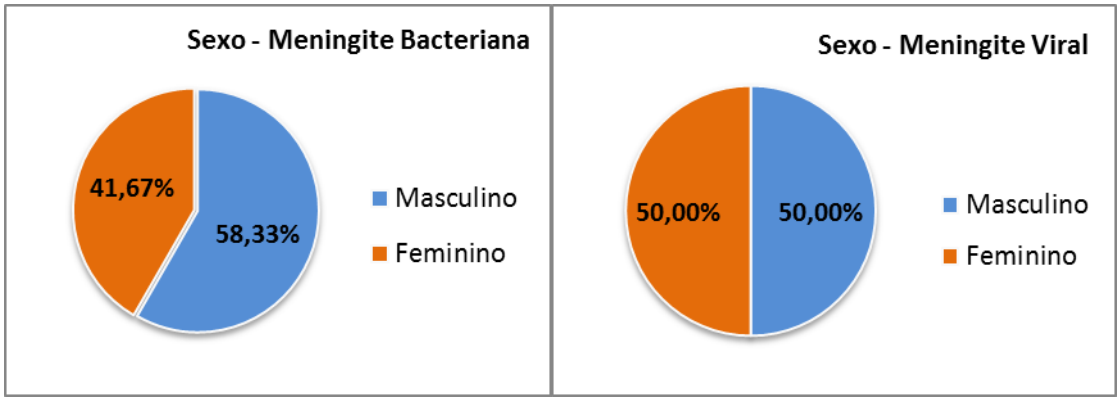
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para descrever a casuística, fizemos uma análise descritiva caracterizando os pacientes por grupos – sexo, sazonalidade, idade, sorogrupo por ano, suspeitas clínicas à esclarecer e os municípios.

De acordo com o levantamento realizado de amostras de óbitos de pacientes com suspeitas de meningite ou meningococcemia, que entraram no Núcleo de Anatomia Patológica do IAL, no período de 2009 a 2015, foram encontrados 320 pacientes, dos quais selecionamos casos de meningite bacteriana e viral.

Na figura 7 temos a incidência da mortalidade por sexo entre a meningite bacteriana e a meningite viral.

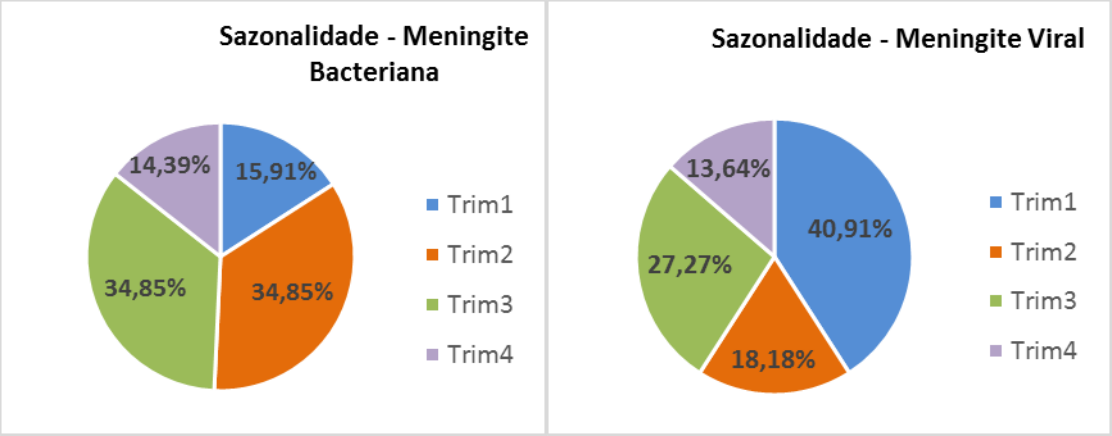
Figura 7 – Incidência por sexo da meningite bacteriana (esquerda) e meningite viral (direita), relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL.



Podemos observar no gráfico a esquerda que dos casos selecionados de meningite bacteriana, 58% eram do sexo masculino, enquanto que 42% eram do sexo feminino, no período de 2010 a 2015. Em 2009 tivemos um caso que não foi realizado o exame imuno-histoquímico por não haver anticorpo padronizado para a técnica. No gráfico à direita, temos a incidência de 50% do sexo masculino e 50% do sexo feminino, nos casos de meningite viral. Há uma variação muito pequena da incidência entre os sexos e entre as meningites.

De acordo com a sazonalidade, podemos observar a diferença entre a meningite bacteriana e a meningite viral na figura 8.

Figura 8 – Incidência por sazonalidade da meningite bacteriana (esquerda) e meningite viral (direita) relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL.



Com relação à meningite bacteriana, a prevalência da doença ocorre no segundo e terceiro trimestres, com 34,85%, equivalendo às estações outono e inverno do ano. De acordo com a literatura, a meningite bacteriana ocorre durante todo o ano, principalmente no inverno, o que equipara aos nossos resultados (ROSENSTEIN et al., 2001). Já na meningite viral, observamos que a prevalência ocorre no primeiro trimestre, com 41%, seguido do terceiro trimestre, com 27%. Como a maioria dos casos eram de dengue e influenza A e H1N1, isto fundamenta a prevalência dos nossos resultados serem nas estações verão e inverno respectivamente.

Além desses parâmetros, correlacionamos as idades dos pacientes para visualizar a distribuição pelas meningites bacteriana e viral (figura 9 e 10).

Figura 9 – Distribuição por faixa etária da meningite bacteriana relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL.

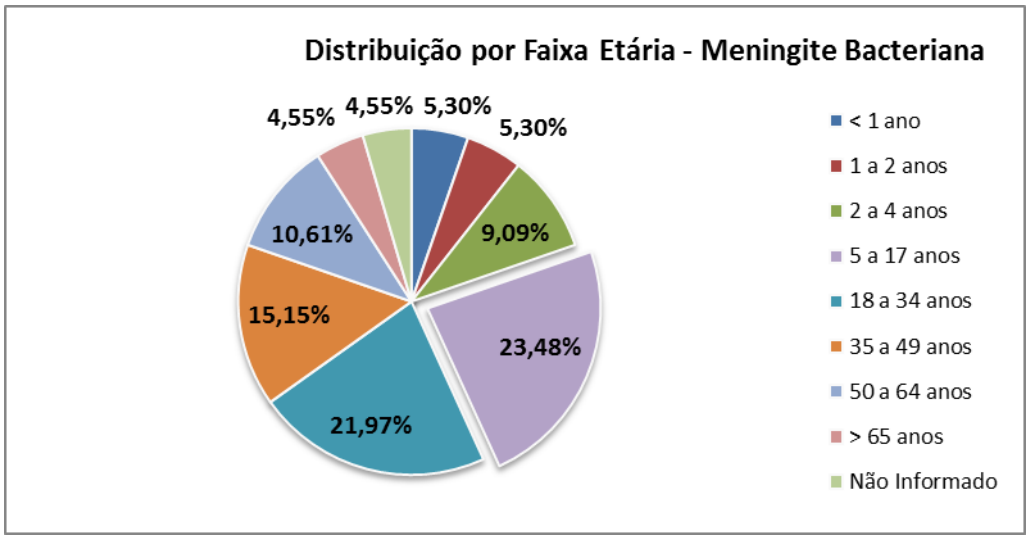
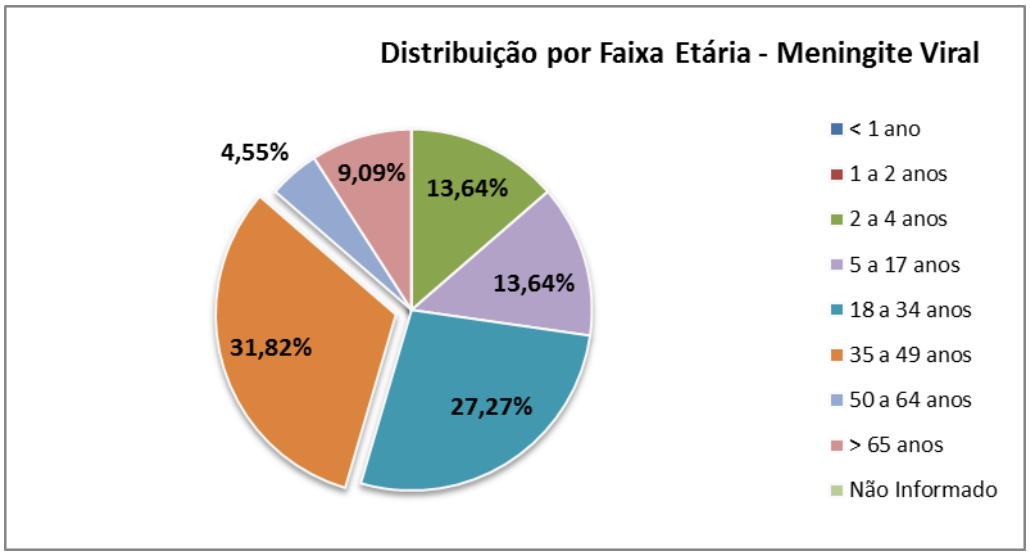


Figura 10 – Distribuição por faixa etária da meningite viral relacionado ao período de 2009 a 2015, dos casos levantados no NAP-IAL.

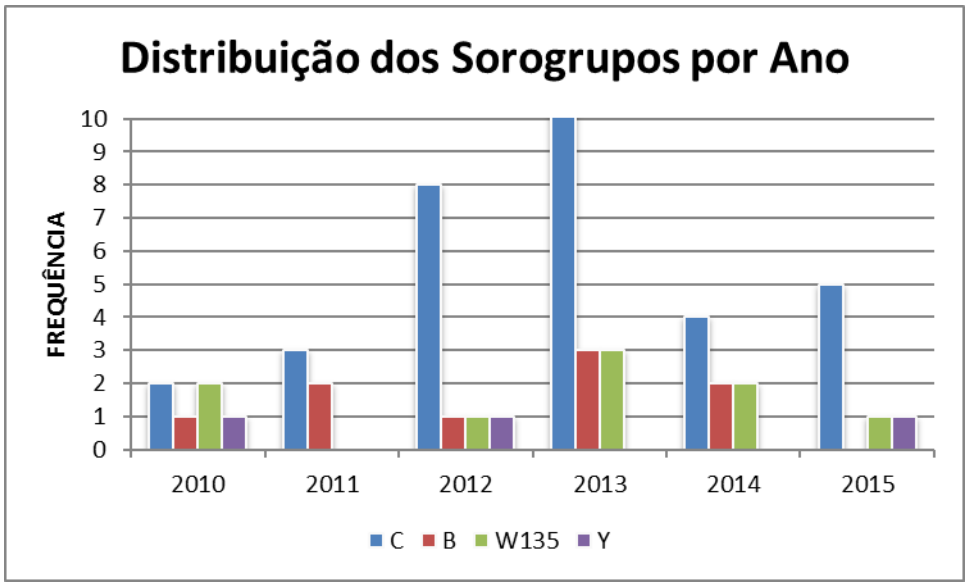


Referente aos gráficos acima, podemos ver na figura 9, a maior incidência da meningite bacteriana está na faixa etária de 5 a 17 anos, com 24% dos casos, seguido da faixa etária de 18 a 34 anos, com 22% dos casos. As taxas estão baixas na infância, porém aumentam na adolescência e nos adultos jovens. De acordo com a literatura, os

casos vêm aumentando desde a década de 90 entre os adolescentes, com idades entre 16 e 25 anos (ROSENSTEINS et al., 2001). Com relação à figura 10, a faixa etária de 35 a 49 anos é a mais afetada na meningite viral, com 32% dos casos, seguido da faixa etária de 18 a 34 anos, com 28%.

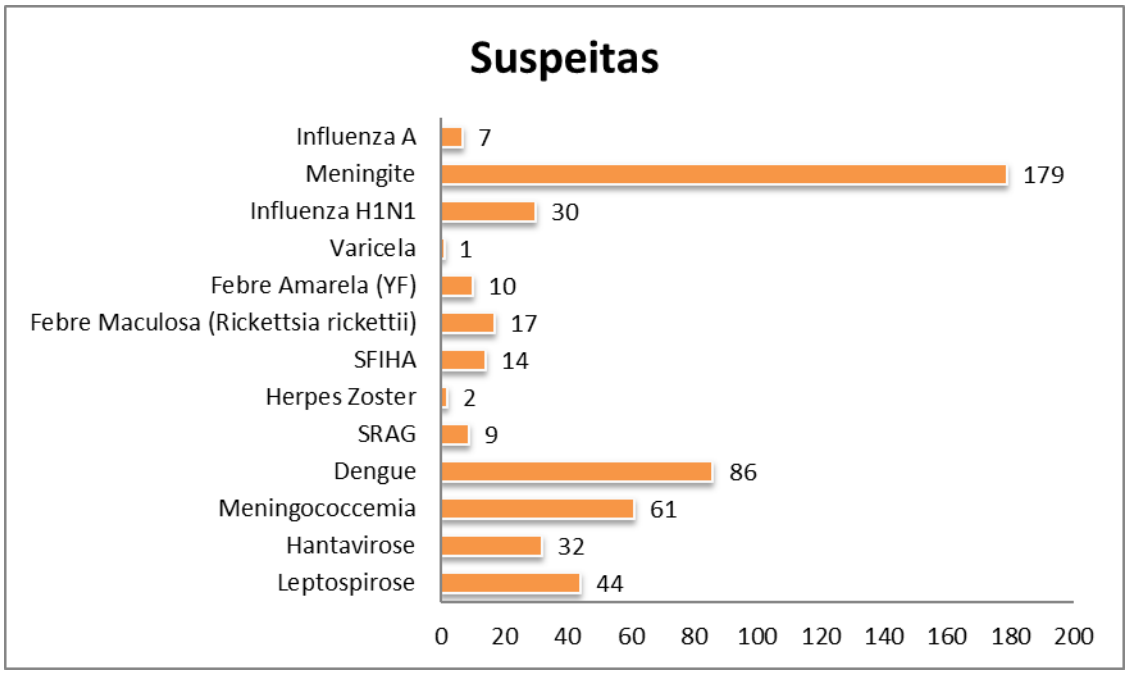
De acordo com os sorogrupos (figura 11), no período de 2009 a 2015 dos dados levantados no NAP-IAL, a prevalência por ano é do sorogrupo C, sendo este o predominante no Brasil, quando comparado com dados epidemiológicos do país. O sorogrupo W vem emergindo nos últimos anos no Brasil, enquanto que o sorogrupo B vem diminuindo a sua incidência no país.

Figura 11 – Prevalência dos sorogrupos nos últimos 6 anos dos dados levantados no NAP-IAL.



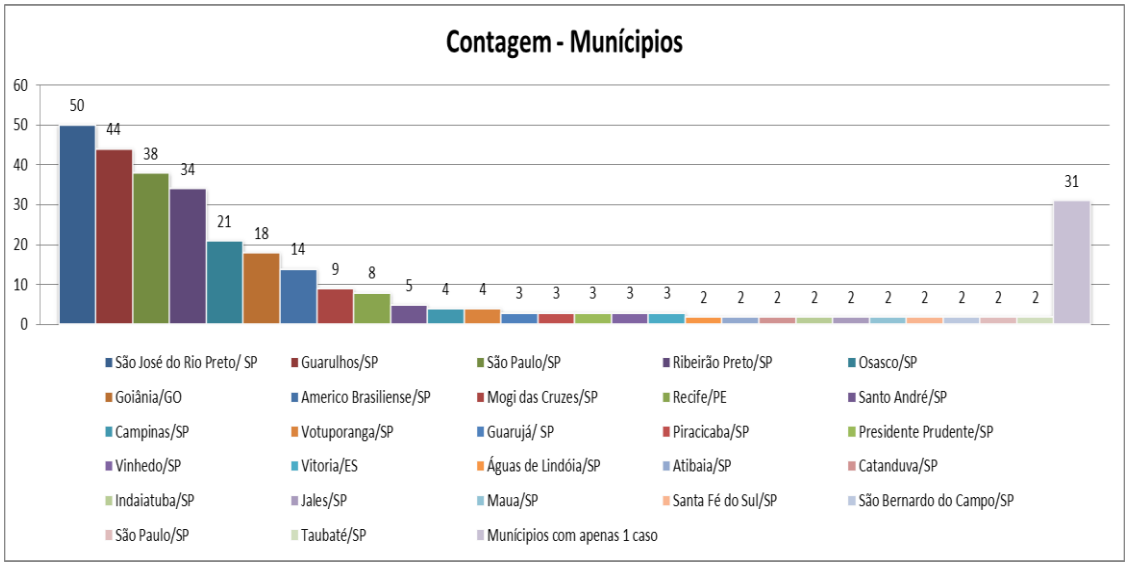
Para a realização do levantamento de dados, amostras de óbitos de pacientes com suspeitas clínicas de meningite ou meningococcemia, que entraram no NAP-IAL, no período de 2009 a 2015, foram analisadas. Porém, de acordo com a figura 12, outras suspeitas confrontavam, como influenza A, H1N1, dengue, febre maculosa, entre outras.

Figura 12 – Gráfico das suspeitas que confrontavam com a meningite ou a meningococcemia dos 320 casos levantados no NAP-IAL, no período de 2009 a 2015.



As amostras que o NAP-IAL recebem não são apenas da cidade de São Paulo. Outras cidades do Estado de São Paulo também enviam as suas amostras, uma vez que o Instituto Adolfo Lutz é uma instituição de referência nacional e regional. Dos 320 casos, 286 casos vieram do Estado de São Paulo, 18 de Goiás, 8 de Pernambuco, 3 do Espírito Santo, e os Estados de Tocantins, Santa Catarina, Paraná, Piauí e Mato Grosso há 1 caso de cada estado. A figura 13 mostra os municípios que o NAP-IAL recebe amostras.

Figura 13 – Gráfico representativo dos diversos municípios do Estado de São Paulo e de outros Estados que o NAP-IAL recebe amostras.



O Laboratório de IHQ, buscando toda a eficiência, testou dois anticorpos monoclonais, sendo desenvolvidos para meningococos no Laboratório de Anticorpos Monoclonais Antígenos e Adjuvantes. Os dois anticorpos monoclonais foram aplicados a amostras de cérebro de casos de meningite meningocócica, meningite causada por outras bactérias, meningite de etiologia viral e em tecido cerebral sem alterações patológicas.

No presente estudo, todos os blocos e/ou lâminas selecionados no NAP-IAL foram registrados em planilhas, cada caso sendo posteriormente preparadas lâminas com novos cortes histológicos, corados por hematoxilina e eosina e examinados pelos médicos patologistas. Isto é extremamente importante para a garantia da qualidade do processo como um todo. A partir da análise histopatológica, as corretas indicações e seleção do painel de anticorpos pelo patologista, o protocolo de reações para aquele

anticorpo e a interpretação das lâminas depois da reação de IHQ é imprescindível para o rastreamento do caso e liberação do laudo, não restando dúvidas sobre a confiabilidade do processo todo.

Outras metodologias podem auxiliar os patologistas na análise dos casos, como por exemplo o PCR. A metodologia de real-time PCR (RT-PCR) foi introduzida na rotina do Instituto Adolfo Lutz, no Centro de Imunologia, após a sua validação no ano de 2011, para bactérias causadoras de meningite: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Neste trabalho de validação, foi demonstrada uma alta sensibilidade e especificidade quando feito o PCR em líquido cefalorraquidiano e comparado com culturas de bactérias que o resultado foi negativo. A alta sensibilidade foi em torno de 90% descrito para as bactérias *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*. Com isso, o RT-PCR para o diagnóstico de bactérias meningocócicas foi incorporado à saúde pública com sucesso e está sendo utilizado como comparativo dos resultados das reações de IHQ (SACCHI, 2011).

Para a futura utilização, foi realizada nos 10 casos selecionados do Núcleo de Anatomia Patológica, uma reação de IHQ, de acordo com o protocolo pré-estabelecido, utilizando os dois anticorpos monoclonais, o NM e o NL, e o anticorpo policlonal contra *N. meningitidis*. O resultado desta reação está contemplado na tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação comparativa da metodologia de PCR, anticorpos monoclonais NL e NM, e anticorpos policlonais para os diferentes patógenos analisados, em amostras de cérebro de óbitos do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz.

			NM	**NL**	
	n.IHQ	**PCR**	**1:5**	**1:2000**	**Obs.**
1	E43.929	Men C	+	+	IHQ Men poly +
2	E44.423	Men B	+	+	IHQ Men poly +
3	E44.858	Men C	+	+	IHQ Men poly +
4	E45.462	Men C	+	+	IHQ Men poly +
5	E45.808	Men C; Rickettsia	neg	neg	IHQ Men poly neg; IHQ Rickettsia sp poly +
6	E44.430	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
7	E44.436	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
8	E45.411	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
9	E45.459	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
10	E37.861	Rubéola	neg	neg	IHQ Rubéola positivo

Legenda: n. IHQ – número da imuno-histoquímica; PCR – reação em cadeia da polimerase; NM e NL – anticorpos monoclonais; Men – anticorpo policlonal para *Neisseria meningitidis* sorogrupo específico; Strepto – *Streptococcus pneumoniae*.

De acordo com a tabela 2, os dois anticorpos monoclonais apresentaram positividade na reação de IHQ, vista em ambas as lâminas e confirmados os resultados, com os anticorpos policlonais para *N. meningitidis* e pelo PCR.

Todos os casos analisados apresentavam positividade no PCR para *N. meningitidis*. Ter esta metodologia na rotina como comparativo nas reações IHQ auxilia os patologistas, juntamente com o quadro clínico e análise histopatológica, apresenta uma confiabilidade maior para a tomada de decisões.

Nos casos de *N. meningitidis*, a marcação nas lâminas que apresentavam os meningococos pode ser visualizada por meio do cromógeno Naftol-Fast Red, que têm uma coloração vermelha, como visto na figura 14. Esta bactéria tem como estrutura um

diplococo, que é facilmente visualizada nos vasos da meninge ou no parênquima cerebral.

Figura 14 – Avaliação da melhor diluição dos Anticorpos Monoclonais. Caso E43929, tecido cerebral empregando-se a técnica de IHQ com anticorpo monoclonal NL nas diluições 1:1000 (A) e 1:2000 (B). Aumento 400 X.

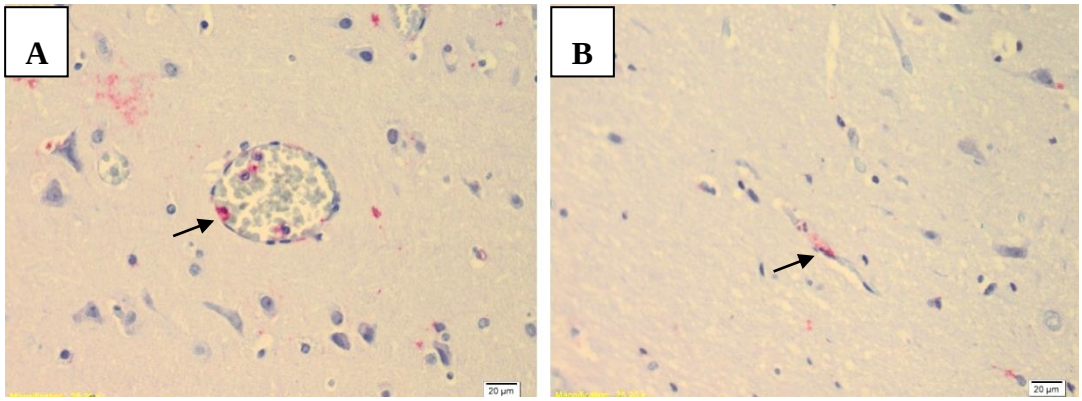
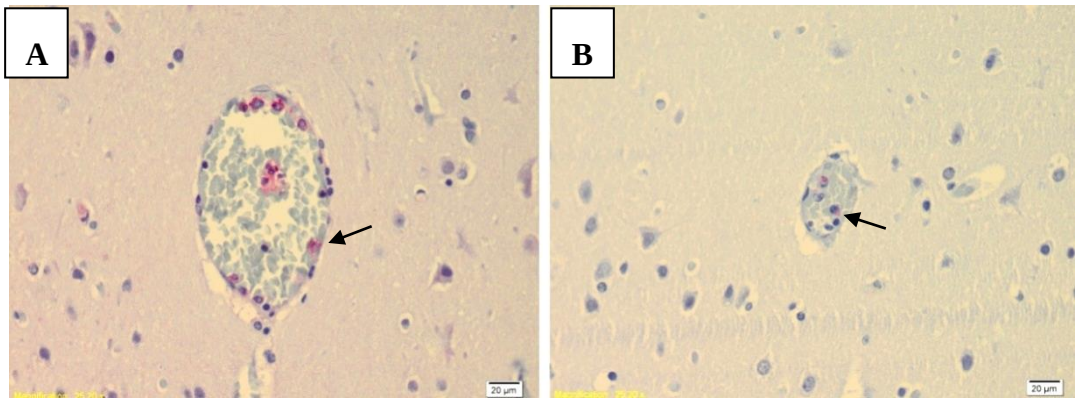


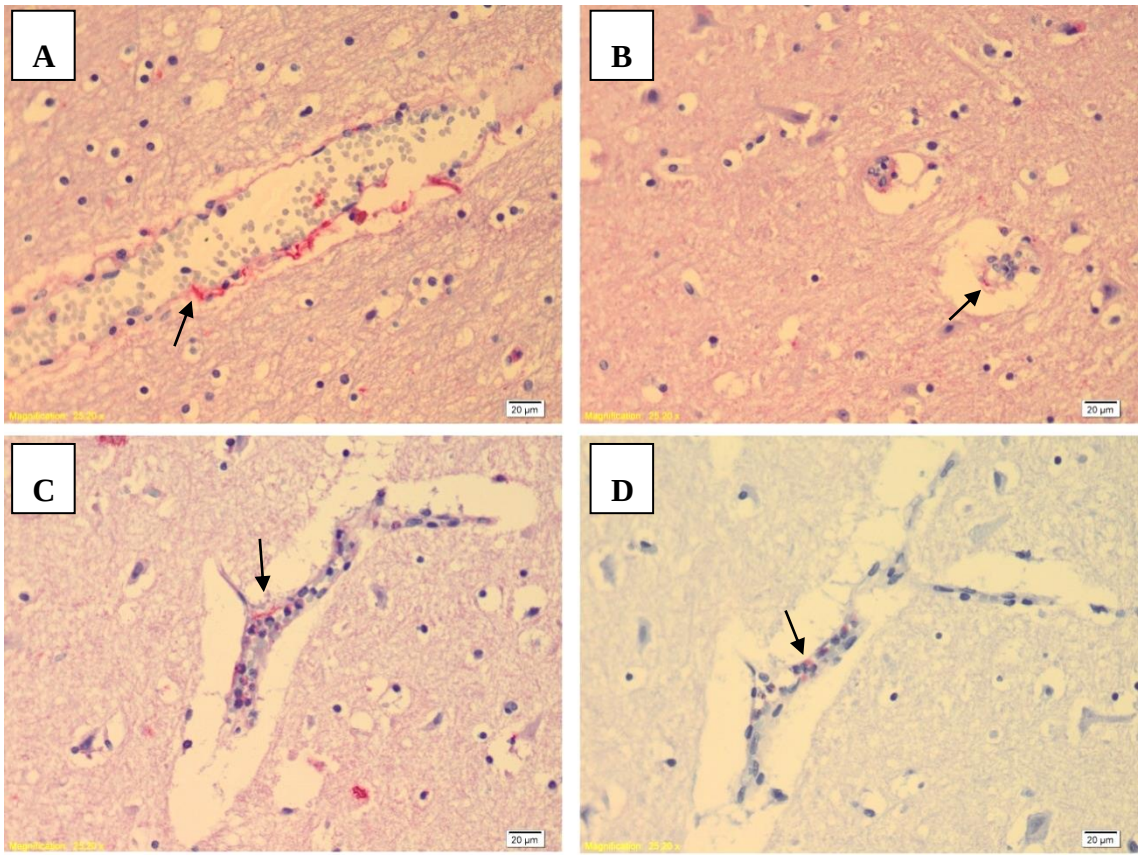
Figura 15 – Avaliação da melhor diluição dos Anticorpos Monoclonais. Caso E43929, tecido cerebral empregando-se a técnica de IHQ com anticorpo monoclonal NM nas diluições 1:2 (A) e 1:5 (B). Aumento 400 X.



Nas figuras 14 e 15, temos a aplicação da técnica de IHQ realizadas no tecido cerebral para o caso E43929 positivo para *N. meningitidis*, sorogrupo C, com os dois anticorpos monoclonais NL e NM. Neste caso, o PCR, o anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis* e os anticorpos monoclonais obtiveram resultados positivos para *N. meningitidis*. Conseguimos comprovar esta positividade por meio das marcações em vermelho, principalmente no vaso cerebral. De acordo com a diluição aplicada na lâmina, resulta em diferentes intensidades desta marcação.

Na figura 16, temos o caso E44423, positivo para *N. meningitidis*, sorogrupo B. Nele foi realizado a técnica de IHQ com os anticorpos policlonal contra *N. meningitidis* na diluição 1:10000, os anticorpos monoclonais NL e NM na diluição 1:10 e em paralelo, foi feito o PCR para *N. meningitidis*, sendo positivo em ambos os ensaios.

Figura 16 – Avaliação da diluição 1:10 dos anticorpo NL e NM. Caso E44423 empregando-se a técnica de IHQ no tecido cerebral. Anticorpos policlonal (A e B) contra *N. meningitidis* diluição 1:10000 e anticorpos monoclonais NL (C) e NM (D). Aumento 400 X.



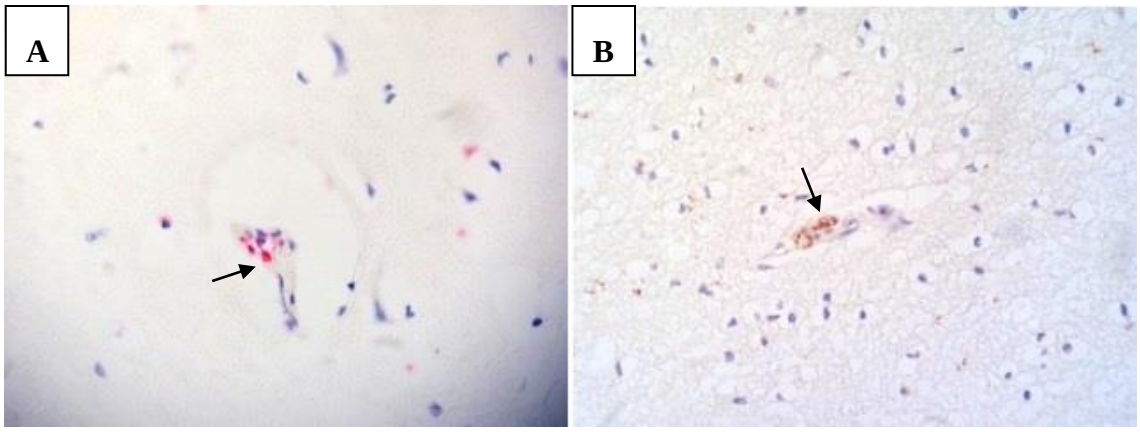
Podemos observar nas imagens que a reação com o anticorpo NL (figura 16 - C) na diluição 1:10 ocorreu uma reação de fundo escura e coloração inespecífica que nos atrapalhasse na análise do caso. Enquanto que com o anticorpo NM (figura 16- D) na mesma diluição, a reação ficou clara, um pouco fraca as marcações, apesar de conseguirmos ver uma marcação leve dentro do vaso. Resolvemos manter a diluição 1:5 do anticorpo NM e a diluição 1:2000 no anticorpo NL, como testado no caso anterior. Com relação ao anticorpo policlonal, podemos observar que ocorre a mesma reação de fundo inespecífica, apesar da diluição ser bem alta do anticorpo. Comparando com os

monoclonais, a coloração do policlonal é bem mais intensa o que dificulta na análise dos casos na rotina, levando a uma incerteza para a liberação de um laudo final.

Na rotina da IHQ, é padronizado o uso da fosfatase alcalina e a revelação com o cromógeno Fast Red nos casos de meningite por *Neisseria meningitidis*, por ser mais fácil de observar os meningococos em vermelho nos vasos cerebrais, quando realizado o exame microscópico. Por este motivo, resolvemos comparar outro cromógeno além do utilizado na rotina.

As colorações mais comuns em uma reação imunoenzimática são: marrom (peroxidase + DAB) e rósea (fosfatase alcalina + fast red). Em nossos estudos, além do cromógeno Fast Red utilizado para a padronização dos anticorpos, foi testado um outro cromógeno, o diaminobenzidina (DAB) que ao reagir com a peroxidase associada a estreptoavidina, emite uma coloração marrom. Podemos observar na figura 17 uma reação IHQ realizada com os dois cromógenos.

Figura 17 – Comparação de dois cromógenos diferentes, no tecido cerebral, empregando-se a técnica de IHQ no caso E45261, utilizando o anticorpo monoclonal NL 1:2000, com colorações diferentes - rósea - fosfatase alcalina + fast red (A) e marrom - peroxidase + DAB (B). Aumento 400 X.

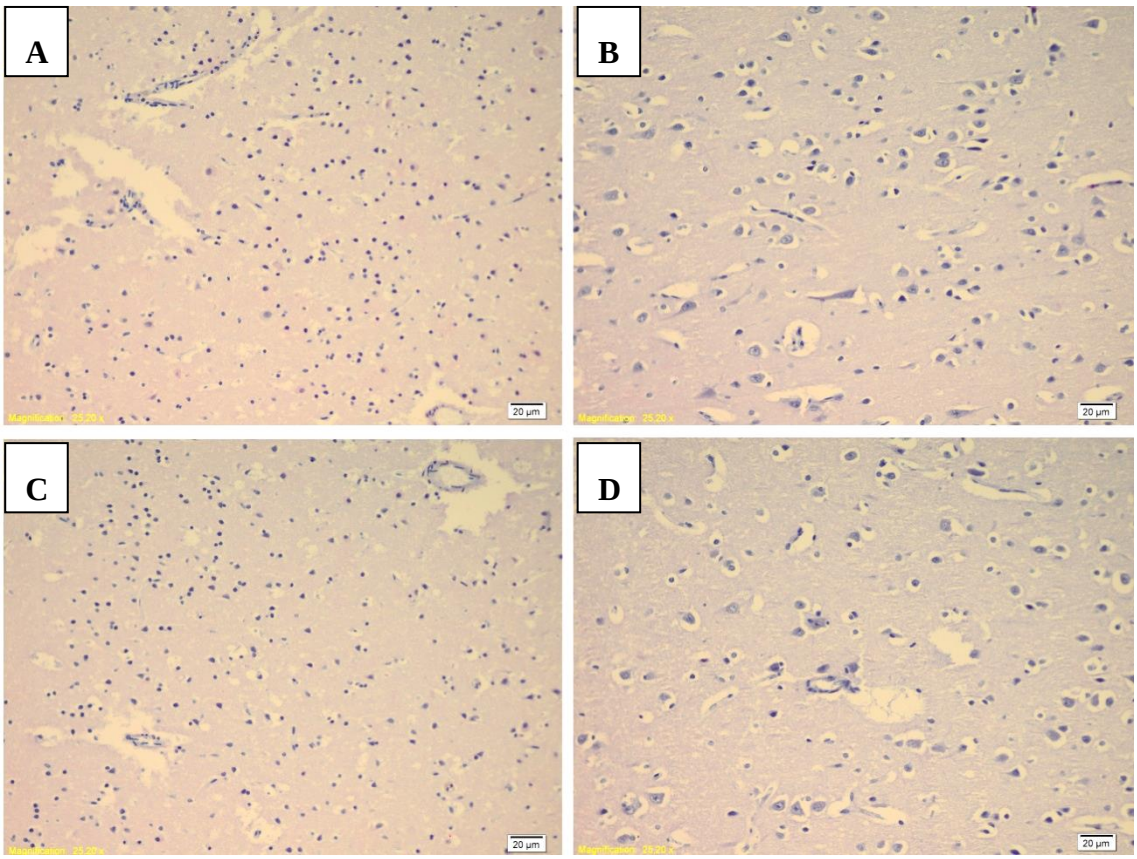


Além dos testes realizados com diferentes diluições dos anticorpos monoclonais e com os dois cromógenos exemplificados na figura 17, os monoclonais NL e NM foram testados em controles negativos. Utilizamos como controles casos de *Streptococcus pneumoniae*, *Rickettsia rickettsii* e um caso com diagnóstico de Rubéola. Os resultados estão contemplados na tabela 2.

Não foi observado marcação positiva nos casos de *S. pneumoniae*, sendo o resultado negativo. Isto também confirmou o que foi visto nas lâminas com o anticorpo policlonal para *N. meningitidis*, que também não teve marcação.

Na lâmina de *Rickettsia rickettsii*, o policlonal para *Rickettsia* foi positivo. Quando aplicado o anticorpo policlonal contra *N. meningitidis* e os dois anticorpos monoclonais, o resultado foi negativo, como observado na tabela 2. O mesmo aconteceu no caso de rubéola, cujo anticorpo contra Rubéola foi positivo e nos dois monoclonais deram negativos (Figura 18).

Figura 18 – Utilização dos anticorpos monoclonais em tecido cerebral no caso E37861, com diagnóstico de rubéola. O resultado foi negativo, não houve marcação utilizando anticorpos monoclonais NL 1:1000 (A) e 1:2000 (B) e NM 1:2 (C) e 1:5 (D) empregando-se a técnica de IHQ com o cromógeno Fast Red. Aumento 400 X.



Isso nos mostrou que, nestes resultados preliminares, os dois anticorpos monoclonais obtiveram excelentes resultados. Não houve reatividade cruzada com *S. pneumoniae*, *Rickettsia rickettsii* ou Rubéola.

As técnicas para diagnósticos laboratoriais para meningites apresentam vantagens e desvantagens quanto a execução e interpretação de resultados, custo elevado com a obtenção de reagentes e reprodutibilidade. No entanto, a escolha do método deve buscar sempre a eficiência no diagnóstico com elevada confiabilidade de seus resultados.

A técnica de IHQ, por ser um método rápido e efetivo, pode ser utilizada na rotina em casos no qual inicialmente há suspeita de doença meningocócica. Na qual são utilizadas amostras de tecido humano, principalmente de cérebros, que auxiliam no diagnóstico e no estudo dos mecanismos patogênicos da bactéria.

Ensaios IHQ possibilitam a detecção das bactérias e de seus antígenos, mantendo as características morfológicas do tecido. No caso da bactéria *N. meningitidis*, encontrada exclusivamente nos tecidos humanos, a técnica de imuno-histoquímica é utilizada para melhor compreender a doença meningocócica, auxiliando na validação do que se têm observado em estudos *in vitro*. (ROSENSTEIN, 2001)

A análise IHQ feita em amostras de tecido fixados em formol e emblocados em parafina oferecem várias vantagens, incluindo um diagnóstico específico para *N. meningitidis*, preservação das características morfológicas do tecido (que permite a localização dos meningococos em células específicas) (GUARNER, 2004), registro permanente por meio das lâminas e redução do risco biológico para o pessoal de laboratório que trabalham com material parafinado (ALVES, 1999).

A técnica de IHQ utiliza anticorpos para identificar a localização de antígenos em células e tecidos, assim se tornou uma das ferramentas mais poderosas para a biologia celular. A potencialidade do emprego de anticorpos monoclonais de especificidade muito bem definida em ensaios diagnósticos é enorme (GRIFFITHS; LUCOCQ, 2014).

Após a padronização em 10 casos, utilizamos um número maior de amostras com objetivo de comprovar a eficiência e sensibilidade dos dois anticorpos monoclonais na reação de imuno-histoquímica. A tabela 3 contempla todos os 50 casos que foram realizados os ensaios imuno-histoquímicos, com o número da lâmina do paciente, o sexo, a idade do paciente, o município que a amostra veio, os dois anticorpos utilizados e por último, o agente etiológico que foi encontrado na amostra.

Tabela 3 – Reatividade dos anticorpos monoclonais NL e NM contra *N. meningitidis* no ensaio imuno-histoquímico para cada caso selecionado.

	CASOS	SEXO	IDADE	MUNICÍPIO	PCR	ANTICORPO NL 1:2000	ANTICORPO NM 1:5
1	E41120	M	18 A	São José do Rio Preto	*N. meningitidis*	+	+
2	E43096	M	30 A	São Caetano do Sul	*N. meningitidis*	+	+
3	E43886	F	62 A	São Paulo	*N. meningitidis*	+	+
4	E43929	M	30 A	Penápolis	*N. meningitidis*	+	+
5	E44423	M	05 m	Guarulhos	*N. meningitidis*	+	+
6	E44437	M	19 A	São Paulo	*N. meningitidis*	+	+
7	E44858	M	43 A	Guarulhos	*N. meningitidis*	+	+
8	E45404	F	46 A	Ribeirão Preto	*N. meningitidis*	+	+
9	E45462	F	04 A	Guarulhos	*N. meningitidis*	+	+
10	E45808	M	24 A	Presidente Prudente	*N. meningitidis*	+	+
11	E47149	M	02 A	Ribeirão Preto	*N. meningitidis*	+	+
12	E47294	M	02 A	Ribeirão Preto	*N. meningitidis*	+	+
13	E47434	M	02 A	Ribeirão Preto	*N. meningitidis*	+	+
14	E47537	M	32 A	Campo Grande	*N. meningitidis*	+	+
15	E47699	F	19 A	Guarulhos	*N. meningitidis*	+	+
16	E47702	M	19 A	São Paulo	*N. meningitidis*	+	+
17	E47711	F	30 A	Guapiaçu	*N. meningitidis*	+	+
18	E47712	M	14 A	São José do Rio Preto	*N. meningitidis*	+	+
19	E43475	M	NI	São Paulo	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
20	E43742	F	21 A	Diadema	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
21	E43928	M	01 A	São Paulo	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
22	E47429	F	20 A	Guarulhos	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
23	E47472	M	35 A	Guarulhos	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
24	E47637	F	12 A	Osasco	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
25	E47683	M	24 A	Ribeirão Preto	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg
26	E47783	M	61 A	Taubaté	Neg p/ *N. meningitidis*	Neg	Neg

27	E44430	F	05 m	São José do Rio Preto	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
28	E44436	M	03 A	São Paulo	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
29	E45459	M	46 A	Osasco	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
30	E46255	F	30 A	Mogi das Cruzes	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
31	E47046	M	50 A	Taubaté	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
32	E47464	M	17 A	São José do Rio Preto	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
33	E47542	F	07 A	Américo Brasiliense	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
34	E47682	F	64 A	Ribeirão Preto	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
35	E47753	M	67 A	São José do Rio Preto	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
36	E47852	M	45 A	Ribeirão Preto	*S. pneumoniae*	Neg	Neg
37	E43938	M	05 A	São Paulo	*H. influenzae*	Neg	Neg
38	E45054	M	08 m	Guarulhos	*H. influenzae*	Neg	Neg
39	E47021	M	15 A	Osasco	*H. influenzae*	Neg	Neg
40	E47475	M	50 A	Jundiaí	*Não realizado Rickettsia rickettsii*	Neg	Neg
41	E47683	M	24 A	Ribeirão Preto	*Não realizado Rickettsia rickettsii*	Neg	Neg
42	E47684	M	44 A	Indaiatuba	*Não realizado Rickettsia rickettsii*	Neg	Neg
43	E47768	M	02 A	Santo André	*Não realizado Rickettsia rickettsii*	Neg	Neg
44	E44614	F	02 A	Américo Brasiliense	Não realizado Influenza A	Neg	Neg
45	E46068	F	42 A	São José do Rio Preto	Não realizado Influenza A	Neg	Neg
46	E44663	M	20 A	Ribeirão Preto	Não realizado Dengue	Neg	Neg
47	E44782	M	49 A	São José do Rio Preto	Não realizado Dengue	Neg	Neg
48	E44842	F	46 A	São Paulo	Não realizado Dengue	Neg	Neg
49	E46728	F	09 A	Mogi das Cruzes	Não realizado Varicela	Neg	Neg
50	E47573	F	36 A	Águas de Lindóia	Não realizado *Cryptococcus sp*	Neg	Neg

Legenda: n. E – número da imuno-histoquímica; Sexo – M: masculino e F: feminino; Idade - A: anos e m: meses; Anticorpos NM e NL – anticorpos monoclonais; Neg: negativo; + : positivo; *N. meningitidis* - *Neisseria meningitidis; S. pneumoniae* - *Streptococcus pneumoniae*; *H. influenzae* – *Haemophilus influenzae;* Neg p/ *N. meningitidis* – PCR negativo para *Neisseria meningitidis.*

Como visto na tabela 3, há uma homologia entre os resultados. Porém, além da reação de imuno-histoquímica, de acordo com a literatura, as meningites possuem um predomínio celular que auxilia no diagnóstico histopatológico das amostras. Na tabela 4, apresentamos os tipos celulares comparativamente que aparecem nas meningites bacterianas e virais (FOCHESATTO, 2013).

Tabela 4 – Análise do predomínio celular das meningites bacteriana e viral, baseados na literatura de Fochesatto, 2013.

MENINGITE	CÉLULAS	PREDOMÍNIO CELULAR
MENINGITE BACTERIANA AGUDA	NEUTRÓFILOS	POLIMORFONUCLEARES
MENINGITE BACTERIANA PURULENTA	LINFÓCITOS, NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS	POLIMORFONUCLEARES
MENINGITE VIRAL	LINFÓCITOS	MONONUCLEARES

Para correlacionar o predomínio celular dos achados histopalógicos das amostras com a literatura, analisamos especificamente 22 casos do estudo, de diferentes patógenos, com seus respectivos predomínios celulares e contemplamos na tabela 5.

Tabela 5 – Análise do predomínio celular dos casos selecionados do levantamento feito no NAP-IAL.

	CASOS	PREDOMÍNIO CELULAR	AGENTES ETIOLÓGICOS
1	E44663	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	Dengue
2	E44782	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	Dengue
3	E45054	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*H. influenzae*
4	E45462	INFILTRADO LINFOHISTIOCITÁRIO	*N. meningitidis*
5	E46255	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	*S. pneumoniae*
6	E46728	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	Varicela
7	E47021	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*H. influenzae*
8	E47149	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*N. meningitidis*
9	E47294	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	*N. meningitidis*
10	E47429	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*S. pneumoniae*
11	E47464	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*S. pneumoniae*
12	E47472	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	NEG. *N. meningitidis*
13	E47542	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*S. pneumoniae*
14	E47573	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	*Cryptococcus sp*
15	E47682	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	*S. pneumoniae*
16	E47683	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*Rickettsia rickettsii*
17	E47699	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*N. meningitidis*
18	E47711	AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS	*N. meningitidis*
19	E47712	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	*N. meningitidis*
20	E47768	INFILTRADO LINFOCITÁRIO	*Rickettsia rickettsii*
21	E47783	INFILTRADO COM MACRÓFAGOS	NEG. *N. meningitidis*
22	E47852	INFILTRADO LINFOMONONUCLEAR	*S. pneumoniae*

Para verificar se os epítopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais podiam ser detectados no tecido cerebral de amostras de autópsia suspeitas de meningite ou meningococcemia, foram feitas análises imuno-histoquímicas**.**

As figuras abaixo contribuem para a caracterização dos anticorpos monoclonais como marcadores diferenciais. Por microscopia, no aumento de 40x, os casos abaixo foram fotografados para ilustrar as reações de IHQ no tecido cerebral dos casos selecionados para análise. De acordo com a padronização feita, os dois anticorpos monoclonais mostraram ser adequados para serem empregados em análises imuno-histoquímicas.

O caso E47434, positivo no PCR para *N. meningitidis*, sorogrupo C, foi realizado várias colorações para a análise do caso: coloração de hematoxilina e eosina na meninge (figura 19 - A); coloração de Gram nos vasos do cérebro (figura 19 - B) e imuno-histoquímica para o anticorpo policlonal e os dois anticorpos monoclonais (NL e NM) em dois cromógenos diferentes – Fast Red e DAB (figuras 20 e 21).

Figura 19 – Análise do caso E47434 pela coloração de Hematoxilina-eosina na meninge (A) e coloração de Gram nos vasos (B). Aumento 400 X.

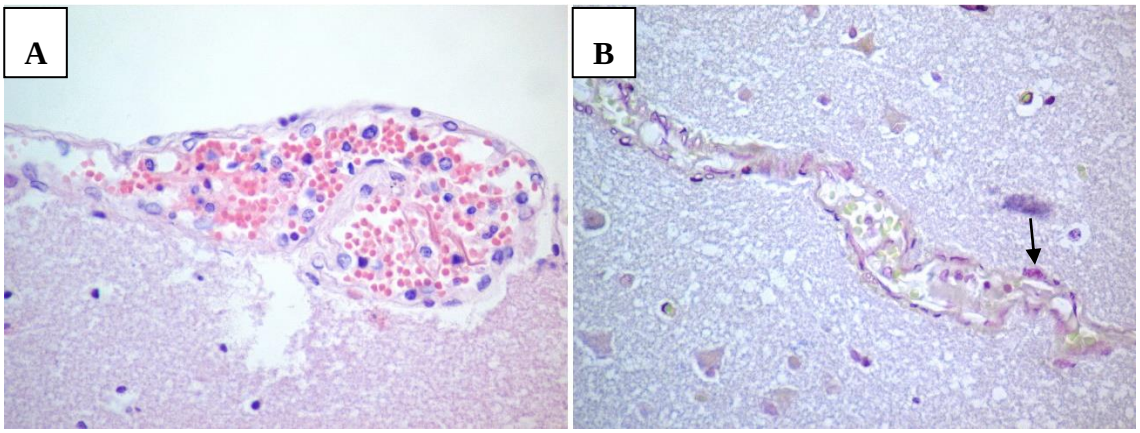


Figura 20 – Análise do caso E47434 empregando-se a técnica de IHQ utilizando anticorpos policlonal contra *N. meningitidis* (A), monoclonais NL (B) e NM (C) com o uso do cromógeno Fast Red. Aumento 400 X.

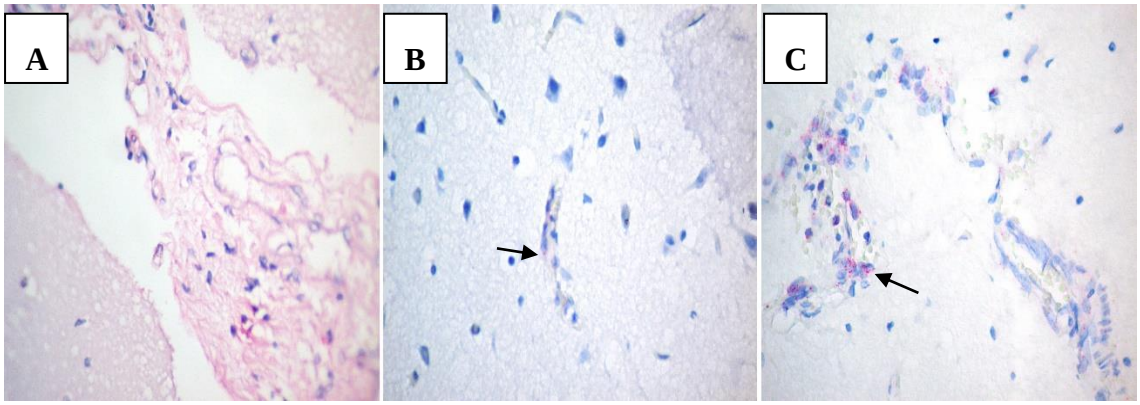
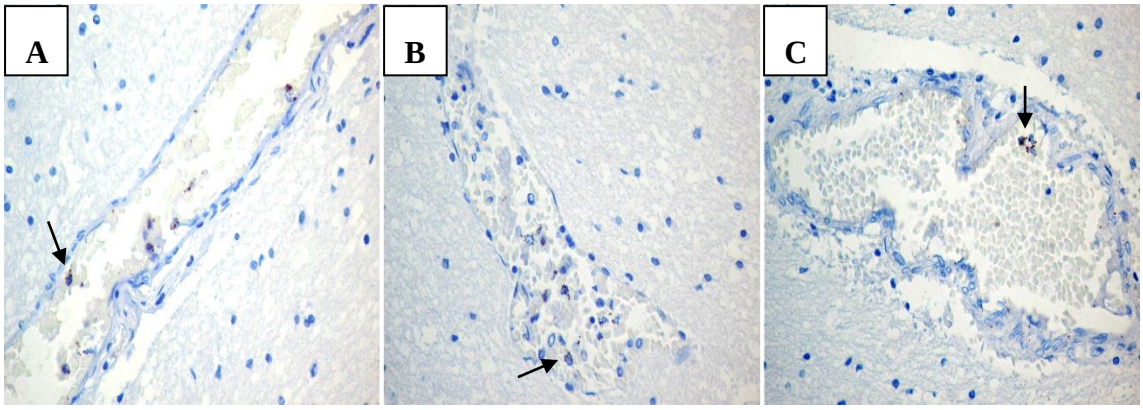


Figura 21 - Análise do caso E47434 empregando-se a técnica de IHQ utilizando anticorpos policlonal contra *N. meningitidis* (A), monoclonais NL (B) e NM (C) com o uso do cromógeno DAB, que resulta em uma marcação marrom. Aumento 400 X.



Como podemos observar nas imagens acima, a reação de IHQ com o anticorpo policlonal não resulta em uma reação de fácil visualização, causa dúvidas quando aplicado na rotina, uma vez que houve uma reação inespecífica com o cromógeno Fast Red no tecido cerebral (figura 20 – A). Com os anticorpos monoclonais, podemos ver marcações positivas no vaso cerebral, como mostra a figura 20 - B e C.

A reação entre antígeno e anticorpo não é visível ao microscópio. É necessário utilizar um marcador. Na reação de IHQ são utilizadas enzimas para auxiliar na visualização, entre elas, a peroxidase e a fosfatase alcalina. Cada enzima tem seus substratos específicos e cromógenos para produzir uma coloração precipitante. A escolha da enzima e do cromógeno irá depender de alguns fatores, como por exemplo, a localização do antígeno, a presença ou ausência de pigmentos endógenos e a intensidade da reação (RAMOS-VARA, 2005).

Mas também têm a questão de preferência e facilidade de visualização pelos patologistas. Muitos laboratórios preferem trabalhar com a peroxidase, mas a fosfatase alcalina também é um marcador muito valioso.

Para a peroxidase, o tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) é o cromógeno mais comumente usado, e na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase, forma um polímero de coloração marrom, precipitando no local no qual se encontra a peroxidase. No entanto, se durante a reação IHQ, não houver o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, haverá a formação de precipitado marrom no qual se encontra a peroxidase (RAMOS-VARA, 2005). A utilização da fosfatase alcalina torna o método mais sensível do que métodos utilizando a peroxidase, sem falar da visualização, que dependendo do patógeno, a utilização da peroxidase torna a análise mais difícil para os patologistas.

Por isso, no Laboratório de Imuno-histoquímica do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, foi padronizado a utilização da fosfatase alcalina com o cromógeno Fast Red para identificação rápida dos meningococos nos tecidos cerebrais.

Figura 22 – Análise da reação IHQ no cérebro do caso E47699 comparando os anticorpos NL (A) e NM (B) utilizando o cromógeno Fast Red e NL (C) e NM (D) utilizando o cromógeno DAB. Aumento 400 X.

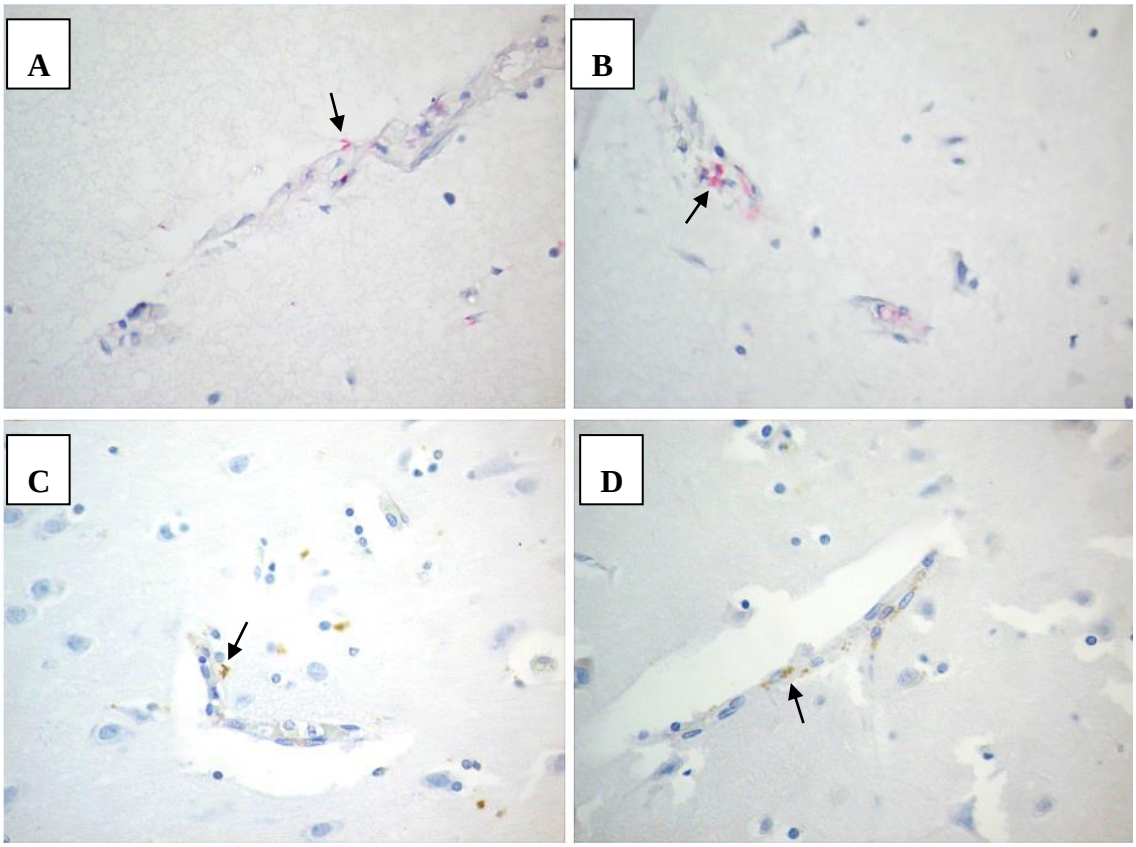


Figura 23 – Análise da reação de IHQ no pulmão do caso E47699 utilizando os anticorpos monoclonais NL 1:2000 (A) e NM 1:5 (B) utilizando o cromógeno Fast Red, que resulta em uma marcação rósea. Aumento 400 X.

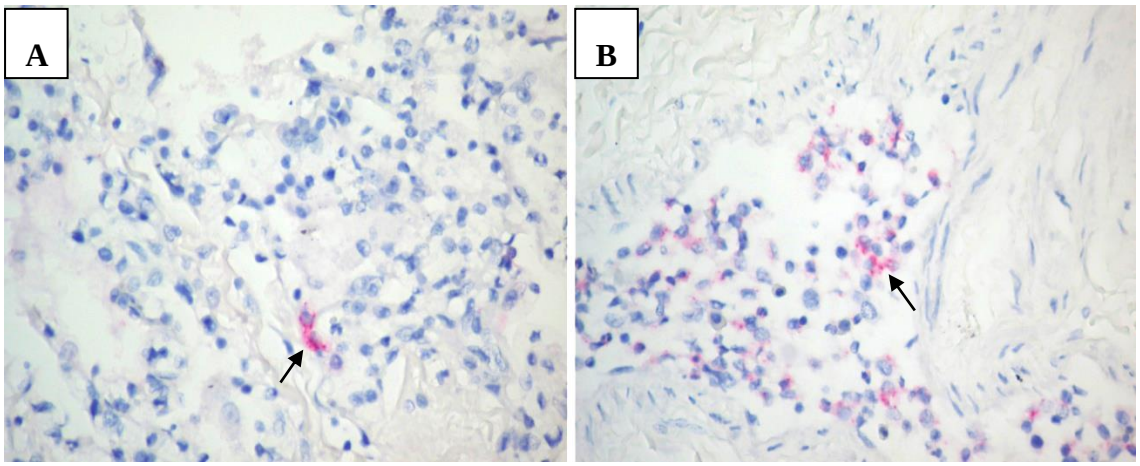
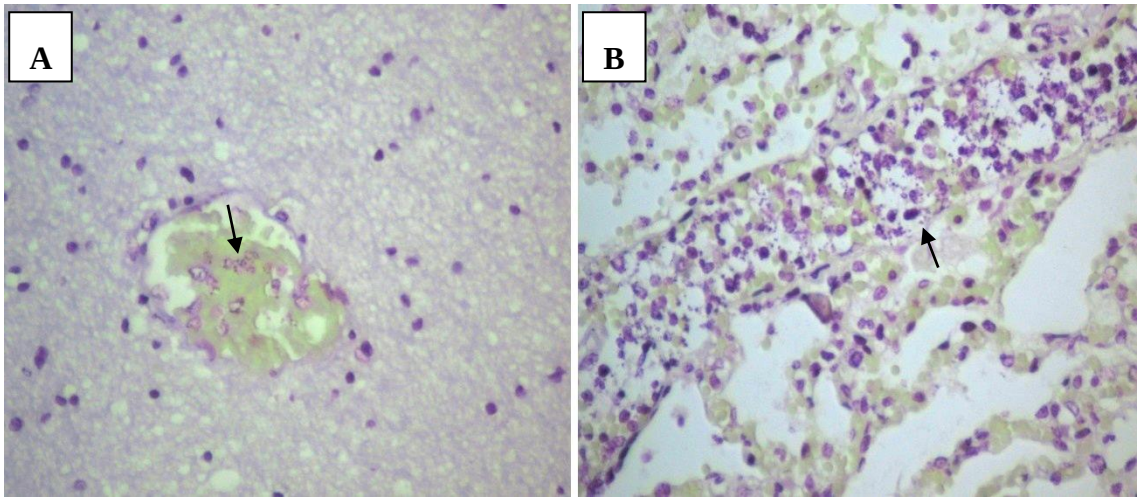


Figura 24 – Análise da Coloração de Gram no caso E47699 positivo para *N. meningitidis*, realizado no cérebro (A) e no pulmão (B). Aumento 400 X.



As figuras 22, 23 e 24 se referem ao caso E47699, positivo no PCR para *N. meningitidis* sorogrupo B. Foram testados os anticorpos NL e NM em dois cromógenos em amostras de cérebro para ver a diferença da sensibilidade na reação de imuno-histoquímica, o cromógeno DAB e o Fast Red (figura 22). Além disso, foram utilizados os monoclonais no tecido do pulmão (figura 23) e foi confirmada a positividade no caso, houve reatividade nos dois anticorpos monoclonais. Neste caso, também foi realizado nos tecidos do cérebro e do pulmão a coloração de Gram (figura 24), para comparar com a IHQ quanto a sensibilidade das técnicas para a bactéria *N. meningitidis.*

Na literatura é bem caracterizado as diferenças entre os dois tipos de anticorpos policlonal e monoclonal, o primeiro reconhecido pelos seus múltiplos epítopos de um mesmo antígeno, enquanto que o monoclonal tem reatividade para um único epítopo do antígeno, resultando em alta especificidade e afinidade. (ABBAS, 2015)

Ambos, os anticorpos policlonais e monoclonais são amplamente utilizados na imuno-histoquímica e em geral, o uso dos anticorpos policlonais neste ensaio é bem sucedida. Porém é possível haver reatividade cruzada, ou seja, um anticorpo ou uma população de anticorpos podem se ligar aos epítopos de outros antígenos. A reatividade cruzada ocorre muitas vezes por baixa especificidade do anticorpo, ou pela semelhança de epítopos pertencentes a antígenos distintos (RAMOS-VARA, 2005).

Os anticorpos policlonais são derivados de uma família de células B e reconhecem diversos epítopos diferentes na mesma proteína. As células B podem ser classificadas em clones individuais, cada uma derivada de uma única célula que segrega anticorpos

idênticos. Quando o anticorpo é feito por um único clone, ele é referido como um anticorpo monoclonal. Quando é usado uma mistura de clones, como é o caso dos anti-soros, o anticorpo é um policlonal. (ABBAS, 2015). Com isso, um anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis* poderá se ligar a diversos epítopos enquanto que os anticorpos monoclonais NL e NM do estudo são derivados de um único clone de célula B, sendo específicos para um único epítopo.

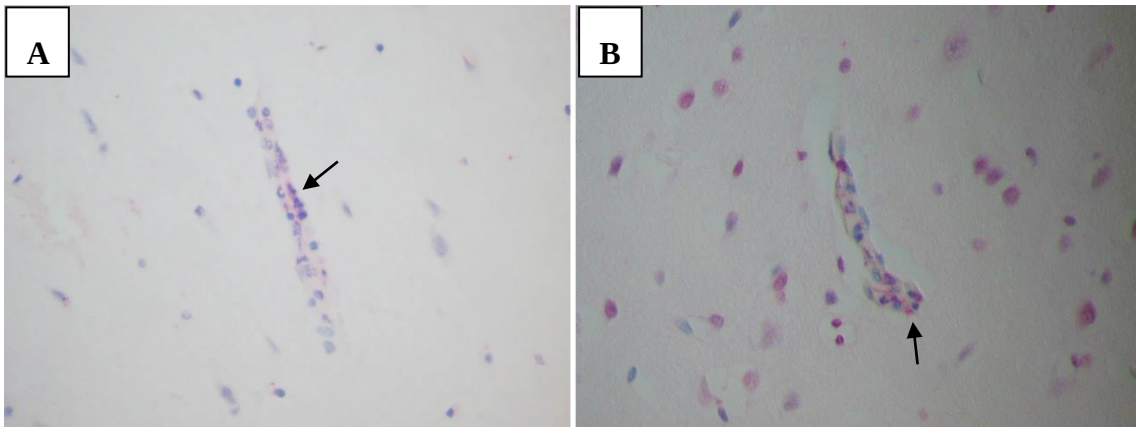
Uma vantagem da utilização dos monoclonais é que estes identificam epítopos que ocorrem somente em casos de meningite por *N. meningitidis*, sem apresentar reatividade cruzada com meningites causadas por outra bactéria ou de origem viral, o que gera um valor epidemiológico significante. Além disso, apresentam qualidade no diagnóstico em termos de especificidade dos epítopos reconhecidos. A meningite viral normalmente é benigna e com um bom prognóstico, caracterizada apenas por um quadro clínico de alteração neurológica. Os casos podem ser isolados ou encontrados como surtos e atingem indivíduos de todas as idades. Já as meningites bacterianas, em especial a meningocócica, causam um temor na população, uma vez que é mais agressiva, com evolução rápida, podendo causar a morte ou deixar sequelas irreversíveis, possui caráter epidêmico.

A coloração de Gram também pode ser considerada um método auxiliar nas análises, consiste em tratamento tintorial utilizado para triagem ou diagnóstico e dependendo do caso, até mesmo confirmatório. O método é utilizado na maioria das infecções bacterianas, permitindo a diferenciação de bactérias Gram positivas de Gram negativas pela diferenciação nas paredes celulares. Esta coloração permite que as bactérias fiquem coradas em tonalidades diferentes, se mostrando uma ferramenta de grande importância no isolamento e identificação no material clínico (MICHALANY, 1998).

Em nossos estudos observamos ser uma técnica simples e rápida que permite o diagnóstico dependendo da carga bacteriana presente nos diferentes tecidos da amostra, se alta, a utilização do Gram juntamente com o PCR seria suficiente para a conclusão e liberação de um laudo. No entanto, sabemos que nem sempre isso é possível, considerando que esta técnica é menos sensível em amostras com menos carga bacteriana quando comparada com a técnica IHQ utilizada neste trabalho.

Há um caso que foi feito a reação de IHQ e ao exame microsópico pudemos observar uma reação mais fraca, com pouca marcação, as células e os vasos do cérebro não estão bem definidos, dificultando a liberação de um resultado preciso, apesar deste caso ter o PCR positivo como exame complementar (figura 25).

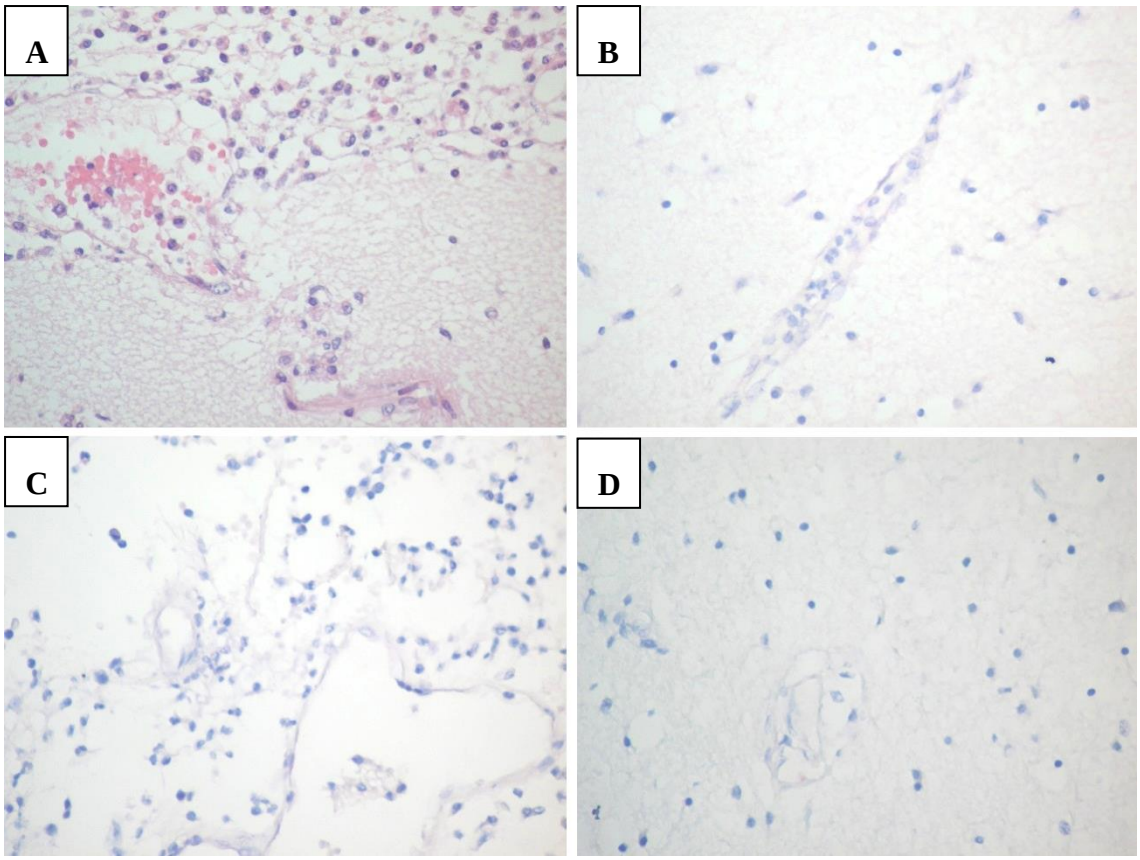
Figura 25 – Análise da reação IHQ no cérebro do caso E47149 utilizando os anticorpos NL (A) e NM (B) com o cromógeno Fast Red. Aumento 400 X.



Como controle negativo do estudo, utilizamos casos que foram selecionados no levantamento com suspeitas de meningite e meningococcemia. No entanto, o desfecho do caso foi para outra doença, como por exemplo, febre maculosa *(Rickettsia rickettsii)*, dengue, influenza A, ou outros patógenos que causam meningite, sem ser *N. meningitidis*, como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae.* Neste cenário, foram realizados ensaios imuno-histoquímicos para todos os casos citados acima.

A figura 26 exemplifica o caso E45054, o qual foi realizado imuno-histoquímica para todos os anticorpos contra *N. meningitidis*, em todas as lâminas analisadas não observou-se marcações, o que levou a conclusão que não era o referido agente etiológico, confirmado pelo exame de PCR, positivo para *Haemophilus influenzae.*

Figura 26 – Análise do caso controle E45054 positivo para *Haemophilus influenzae* – coloração H&E (A) e anticorpos policlonal (B), NL (C) e NM (D), o qual não observou-se marcações utilizando o cromógeno Fast Red. Aumento 400 X.



Outro caso controle foi utilizado testando os anticorpos monoclonais - caso E44614 refere-se a Influenza A, confirmado por imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal. Na figura 27, tem-se o caso com o anticorpo policlonal contra *N. meningitidis* e os dois anticorpos monoclonais, NL e NM. O mesmo foi feito com o caso E44782 (figura 28), o qual foi confirmado o vírus da dengue pelo anticorpo policlonal na reação de Imuno-histoquímica.

Figura 27 - Análise do caso controle E44614 positivo para Influenza A - utilizando anticorpo policlonal contra *N. meningitidis* (A), e os dois anticorpos monoclonais NL (B) e NM (C), o qual não observou-se marcações utilizando o cromógeno DAB, empregando-se a técnica de IHQ. Aumento 400 X.

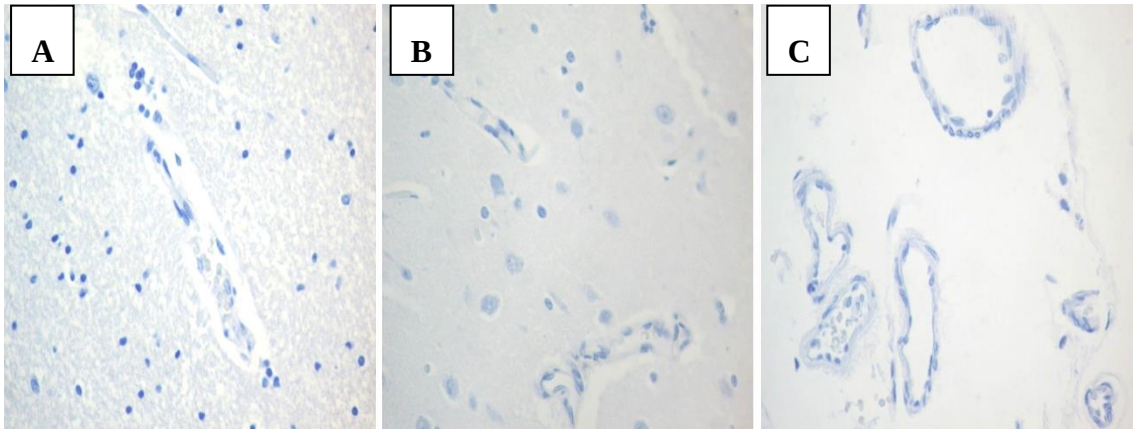
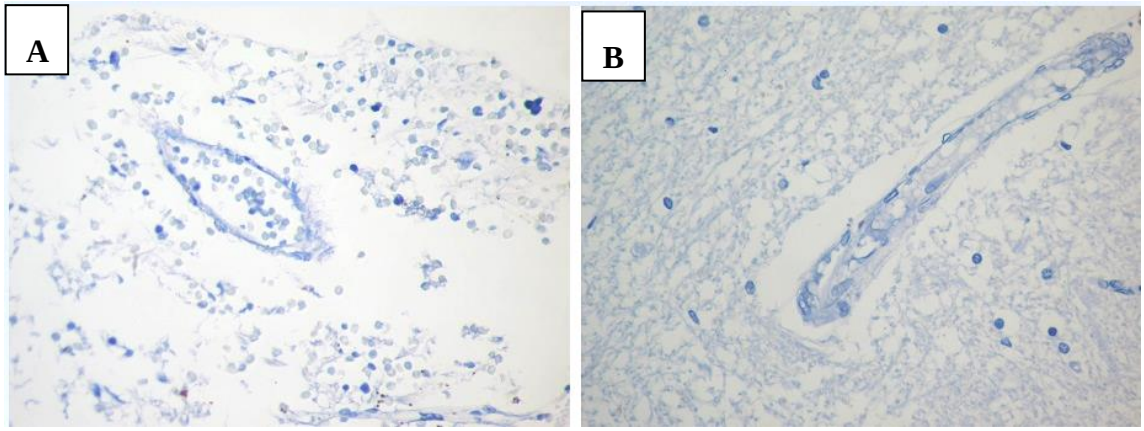


Figura 28 - Análise do caso controle E44782 positivo para Dengue - os dois anticorpos monoclonais NL (A) e NM (B), utilizando o cromógeno DAB, empregando-se a técnica de IHQ. Aumento 400 X.



Nos casos controles negativos do estudo, pudemos verificar que não houve reatividade nas figuras representadas acima. Observamos as lâminas limpas, sem marcações, quando realizado a reação de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-*N.*

meningitidis, diferente do que pudemos observar nas lâminas positivas para o meningococo. Houve marcação dos cocos nos vasos do cérebro e na meninge, bem como no pulmão (figura 23). Os anticorpos monoclonais demonstraram reatividade nas amostras de casos cujo diagnóstico de meningite meningocócica foi confirmado por PCR.

O objetivo da padronização da técnica de IHQ para *N.meningitidis* utilizando anticorpos monoclonais de reatividade cruzada entre os diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos é estabelecer um protocolo que será validado para a implantação e um método mais eficiente e rápido.

Podemos dizer que neste estudo, com utilização da técnica em laboratório, o anticorpo monoclonal foi promissor na reação de IHQ, quando comparado ao anticorpo policlonal. A vantagem de se utilizar os anticorpos monoclonais está na redução da reação de fundo inespecífica como ocorre com o uso dos anticorpos policlonais.

Como citado anteriormente, os anticorpos monoclonais apresentaram reatividade com antígenos de *Neisseria meningitidis* em tecidos cerebrais, podendo ser utilizados como importante ferramenta diagnóstica no esclarecimento de biópsias e autópsias humanas, submetidas ao exame histopatológico. Sendo assim a produção e utilização de anticorpos monoclonais pode ser um passo importante para a auto-suficiência dos laboratórios públicos, com alto valor agregado para a saúde pública com um todo.

5 CONCLUSÃO

O meningococo é o único agente bacteriano causador de meningite que pode causar surtos no Brasil e no Estado de São Paulo, o que nos leva a um alerta permanente contra a doença. A susceptibilidade à aquisição da doença é universal, tornando o indivíduo em qualquer idade, exposto à bactéria, seja na sua casa, no ambiente de trabalho, em viagens de negócios ou a lazer. Com isso, os avanços no diagnóstico são imprescindíveis, principalmente nos serviços públicos de saúde.

De um modo geral, os resultados apresentados neste estudo mostram que a IHQ com os anticorpos monoclonais representa uma alternativa viável no diagnóstico quando comparado a outros métodos hoje disponíveis em nosso meio. Os anticorpos monoclonais do estudo demonstraram uma aplicabilidade imediata na imuno-histoquímica, como uma importante ferramenta diagnóstica na elucidação de biópsias e autópsias humanas quando submetidas ao exame histopatológico e na identificação rápida dos meningococos nos tecidos cerebrais. O desempenho dos anticorpos monoclonais neste estudo nos mostrou superior ao desempenho do anticorpo policlonal utilizado na rotina contra *N. meningitidis*, comprovando sua maior eficácia em termos de diagnóstico. Outras técnicas foram utilizadas e comprovaram a confiabilidade da combinação da reação de IHQ com o uso de anticorpos monoclonais.

O mercado dessas importantes biomoléculas, anticorpos, vem crescendo de forma gradativa. Por esse motivo, estudos que buscam a produção dessas moléculas de alto valor agregado são de fundamental importância em nosso país, reduzindo a dependência de processos de importação para obtenção destes insumos e melhorando a qualidade de nossa saúde pública.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015. 552 p.

ALVES, V. A. F. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. In: ALVES, V. A. F. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. p. 1-9, 1999.

BELO, E. F. et al. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of Neisseria meningitidis and the distribution of this subtype in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 6, p. 407-418, 2004.

BELO, E. F. et al. Production of monoclonal antibodies against Neisseria meningitidis using popliteal lymph nodes and in vivo/in vitro immunization: prevalence study of new monoclonal antibodies in greater Sao Paulo, Brazil. **Hybridoma (Larchmt)**, v. 26, n. 5, p. 302-310, 2007.

BOGER, C. et al. Validation and comparison of anti-alphavbeta3 and anti-alphavbeta5 rabbit monoclonal versus murine monoclonal antibodies in four different tumor entities. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 21, n. 6, p. 553-560, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Meningite. In: **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf>. Acesso em: 22 de abril de 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Immunology and Vaccine-Preventable Diseases.** Meningococcal Disease, 2015. Disponível em: < http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/mening.pdf>. Acesso em: 24 de abril de 2016.

CHANG, Q.; TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention. **Clin. Epidemiol.**, v. 4, p. 237-245, 2012.

CHAVES, L. B. et al. Monoclonal antibodies for characterization of rabies virus isolated from non-hematophagous bats in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 11, p. 1238-1249, 2015.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CORDEIRO, M. L. S. et al. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. **Rev. Saúde Ciência**, v.3, n. 3, p. 252-262, 2014.

DE GASPARI, E.; ZOLLINGER, W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 143-153, 2001.

FERRAZ, A. S. et al. Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in Neisseria meningitidis serotyping by Dot-blot ELISA. **BMC Infect. Dis.**, v. 8, n. 30, p. 1-8, 2008.

FOCHESATTO FILHO, L., BARROS, E. **Medicina Interna na Prática Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1076 p.

GASPARINI, R. et al. Neisseria meningitidis B vaccines: recent advances and possible immunization policies. **Expert Rev. Vaccines**, v. 13, n. 3, p. 345-364, 2014.

GRIFFITHS, G.; LUCOCQ, J. M. Antibodies for immunolabeling by light and electron microscopy: not for the faint hearted. **Histochem. Cell. Biol.,** v. 142, n. 4, p. 347-360, 2014.

GUARNER, J. et al. Pathogenesis and diagnosis of human meningococcal disease using immunohistochemical and PCR assays. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 122, n. 5, p. 754-764, 2004.

HARRISON, L. H.; TROTTER, C. L.; RAMSAY, M. E. Global epidemiology of meningococcal disease. **Vaccine**, v. 27, n. 2, p. 51-63, 2009.

HARRISON, O. B. et al. Description and nomenclature of Neisseria meningitidis capsule locus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 566-573, 2013.

JAY, J. I. et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). **Histopathology**, v. 62, n. 4, p. 563-577, 2013.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KUMAR, V. et al. Patologia Geral das Doenças Infecciosas. In: **ROBBINS: Patologia Básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 309-323.

LADHANI, S. N. et al. The introduction of the meningococcal B (MenB) vaccine (Bexsero(R)) into the national infant immunisation programme--New challenges for public health. **J. Infect.**, v. 71, n. 6, p. 611-614, 2015.

MACNEIL, J. R. et al. Epidemiology of infant meningococcal disease in the United States, 2006-2012. **Pediatrics**, v. 135, n. 2, p. 305-311, 2015.

MARQUES, C. H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica.** 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2005.

MAZZAROTTO, G. A. C. A. **Geração e caracterização de anticorpos monoclonais para dengue e hantavírus – desenvolvimento de insumos com potencial biotecnológico aplicado a saúde.** 2009. 145 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2009.

MCGILL, F. et al. The UK joint specialist societies guideline on the diagnosis and management of acute meningitis and meningococcal sepsis in immunocompetent adults. **J. Infect.**, v. 72, n. 4, p. 405-438, 2016.

MELICAN, K.; DUMENIL, G. Vascular colonization by Neisseria meningitidis. **Curr Opin. Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 50-56, 2012.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 3. ed. São Paulo: Michalany, 1998. 295 p.

MILAGRES, L. G. et al. Immune response of Brazilian children to a Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 10, p. 4419-4424, 1994.

OKIKE, I. O. et al. Trends in bacterial, mycobacterial, and fungal meningitis in England and Wales 2004-11: an observational study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 14, n. 4, p. 301-307, 2014.

PILERI, S. A. et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. **J. Pathol.**, v. 183, n. 1, p. 116-123, 1997.

PINHEIRO, P. **Meningite bacteriana e viral – sintomas, causas e tratamento**, 2016. Disponível em: <http://www.mdsaude.com/2009/05/meningite.html> . Acesso em: 25 de julho de 2016.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet. Pathol.,** v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

RIBEIRO, M. A. **Contribuição ao imunodiagnóstico da leptospirose humana: ênfase ao uso de anticorpos monoclonais.** 2003. 164 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ROTH, J.; FAHIMI, H. D.; DRENCKHAHN, D. Celebration of the 50th anniversary of publication of Histochemistry and Cell Biology. **Histochem. Cell Biol.,** v. 129, n. 1, p. 1-3, 2008.

ROSENSTEIN, N. E. et al. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 18, p. 1378-1388, 2001.

SACCHI, C. T. et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in Sao Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20675, 2011.

SAFADI, M. A. et al. The current situation of meningococcal disease in Latin America and updated Global Meningococcal Initiative (GMI) recommendations. **Vaccine**, v. 33, n. 48, p. 6529-6536, 2015.

SÃO PAULO. Secretaria da Saúde, **Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" (CVE)**, 2016. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/dados/meni_graficos.pdf>. Acesso em: 24 de abril de 2016.

SHI, S.R. et al. Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 7, p. 201-208, 1999.

SOUZA, S. F. et al. Bacterial meningitis and living conditions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 3, p. 323-328, 2012.

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitidis. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 6, p. 687-700, 2000.

VARELLA, D. **Meningite**, 2015. Disponível em: <http://drauziovarella.com.br/virus-e-bacterias/meningite-2/> . Acesso em: 25 de julho de 2016.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL

São Paulo, 25 de junho de 2013

Projeto: **CTC 17 E/2013**

Avaliação de dois anticorpos monoclonais em estudo histopatológico e imuno-histoquimico para meningites.

Coordenador: **Dra. Elizabeth N de Gaspari**

Prezado Diretor Geral,

Encaminho o projeto citado acima, e o parecer final do CTC para avaliação da Diretoria Geral. De acordo com o fluxograma de avaliação dos projetos de pesquisa solicito que o mesmo seja devolvido ao CTC para os devidos encaminhamentos.

O projeto tem por objetivo avaliar dois hibridomas murinos secretores de anticorpos monoclonais contra antígenos de *Neisseria meningitidis*. Com a padronização das reações pretende-se estabelecer protocolo visando à implantação do diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica. O projeto tem a aprovação dos Diretores dos Centros de Imunologia e de Patologia, parceiros no estudo.

A coordenadora apresenta orçamento estimado em R$ 64.000,00, a ser financiado pelo CNPq (Chamada Universal/2013).

O projeto foi avaliado e aprovado quanto ao Mérito Científico pelo CTC.

Atenciosamente,

MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY
PRESIDENTE DO CTC/IAL

Dr. Alberto José da Silva Duarte
Diretor Geral - IAL
RG: 6.553.735-X

ANEXO B – APLICABILIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-NEISSERRIA MENINGITIDIS EM IMUNO-HISTOQUÍMICA

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Aplicabilidade de Anticorpos Monoclonais anti-*Neisseria meningitidis* em Imuno-histoquímica

A técnica imuno-histoquímica (IHQ) para diagnóstico de meningites por *Neisseria* em casos de óbito, com emprego de anticorpos policlonais, tem sido usada no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) desde 2011, com relativo sucesso, tanto em amostras teciduais de cérebro como de supra-renal. O uso de anticorpos policlonais traz alguns problemas diagnósticos na interpretação da reação, principalmente reação de "fundo" inespecífica (*background*), levando a casos falso-positivos.

O uso de anticorpos monoclonais em IHQ é um avanço na qualidade das reações, pois, em se tratando de anticorpos desenvolvidos para epítopos específicos, há a redução de resultados falso-positivos.

A partir de 2013, passamos a testar os anticorpos monoclonais para *N.meningitidis*, denominados "NM" (sobrenadante) e "NL" (ascite), concomitantemente com o policlonal anteriormente em uso, em amostras de casos com suspeita de óbito por meningite e reação de PCR com resultado positivo para *N.meningitidis*. Obtivemos muito bons resultados na reação, com a redução da reação inespecífica de fundo, especialmente com o anticorpo "NM". Até o presente, foram testados em 45 casos de óbitos.

Em análise comparativa dos dois anticorpos monoclonais, "NM" e "NL", o primeiro ("NM") mostrou melhor desempenho, produzindo reação mais limpa e mais nítida. O anticorpo "NL" produziu reação mais "fraca e borrada", o que causa dúvidas na leitura da reação.

Quando comparados os desempenhos dos anticorpos policlonais e monoclonais, estes últimos se mostraram superiores com maior índice de positividade.

Dra. Sílvia D'Andretta Iglezias
Médica patologista

Cristina Takami Kanamura
PqC – Lab. Imuno-histoquímica

ANEXO C – APROVAÇÃO DA COMUNICAÇÃO BREVE PELO CORPO EDITORIAL DA REVISTA DO INTITUTO ADOLFO LUTZ

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Núcleo de Acervo
Corpo Editorial da Revista do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 - CEP 01246-902, São Paulo, SP
Tel/Fax : (11) 3068-2869
rial@saude.sp.gov.br

Carta CERIAL 93/2016

São Paulo, 16 de maio de 2016.

Prezado(s) autor(s)

O Corpo Editorial da Revista do Instituto Adolfo Lutz **APROVOU** a comunicação breve "**Avaliação de anticorpos monoclonais como marcadores diferenciais de meningites bacterianas e virais por meio de técnica imuno-histoquímica**", autoria Thaís Regina Brienza LATARO, Cristina Takami KANAMURA, Cinthya dos Santos CIRQUEIRA, Silvia D'Andretta IGLEZIAS, Elizabeth De GASPARI, para publicação na Revista do Instituto Adolfo Lutz, volume 75, 2016.

Agradecemos sua colaboração.

Atenciosamente,

PEDRO LUIZ SILVA PINTO
Editor Chefe
Revista do Instituto Adolfo Lutz