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

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

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

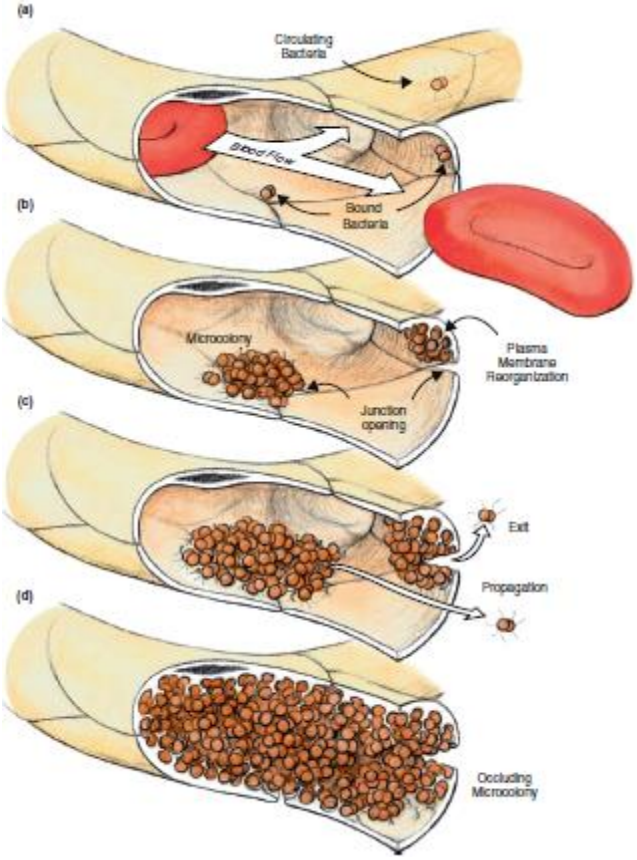
A descrição da progressão da doença, do agente causador e dos sintomas está bem estabelecida, no entanto, as fases iniciais da doença e todo o processo de infecção ainda não são compreendidos. O entendimento da infecção se torna prejudicada, devido a *N. meningitidis* ser um patógeno exclusivo do ser 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).

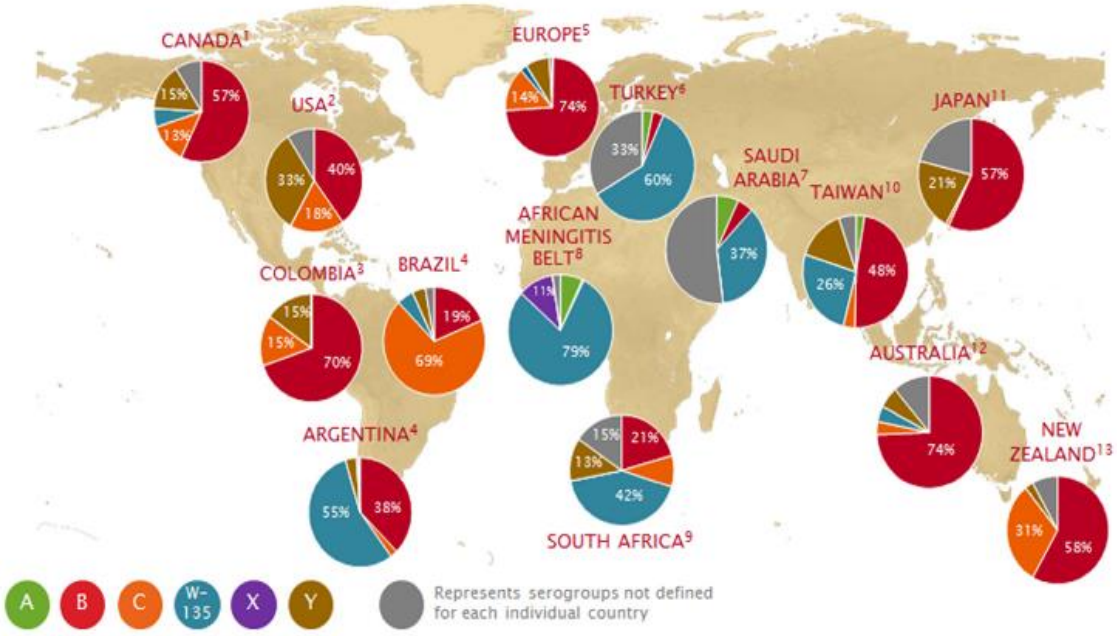
A doença meningocócica ocorre durante todo o ano, principalmente durante o inverno e início da primavera. As taxas de incidência da doença são mais altas nas crianças menores de 5 anos, no qual os anticorpos que os protegem ainda não se desenvolveram. As taxas caem depois da infância e voltam a aumentar 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

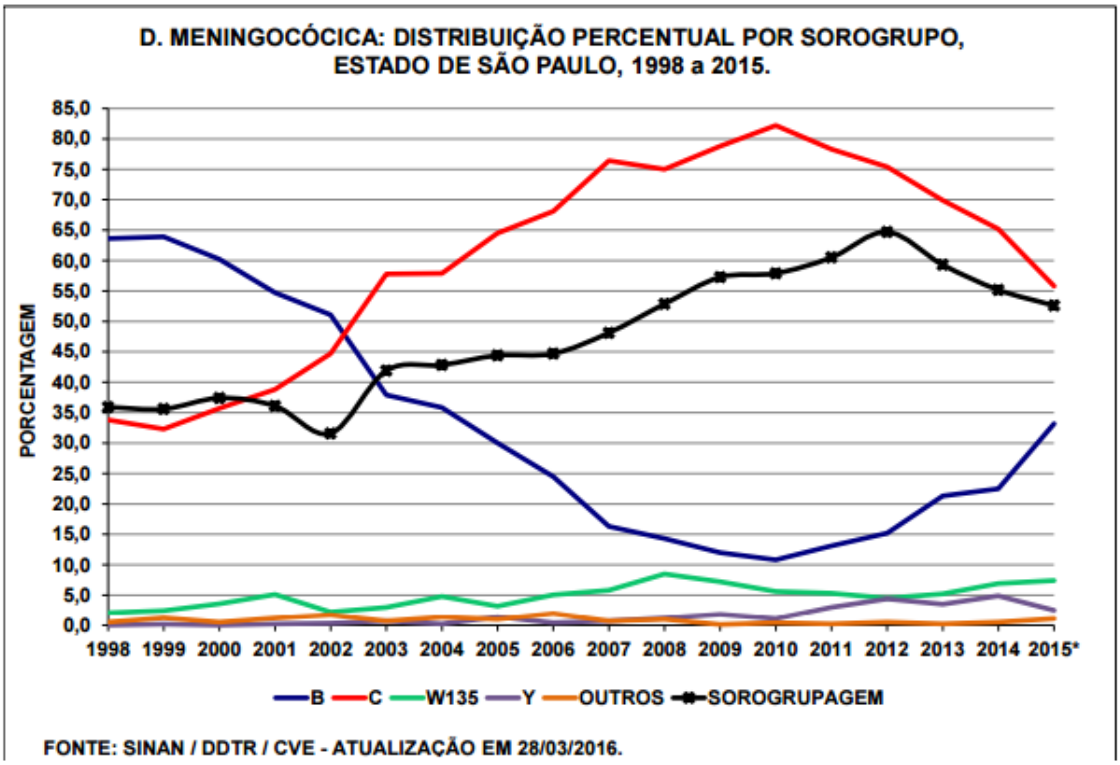
Brasil, no entanto, tem-se o sorogrupo W emergindo nos últimos anos. Em 2011, foram notificados surtos de meningite meningocócica pelo sorogrupo C no Nordeste, em Minas Gerais, São Paulo e no Rio de janeiro. A incidência média no Brasil é de 1,9/100.000 hab/ano, mas pode variar de 1,3 a 2,9 casos por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

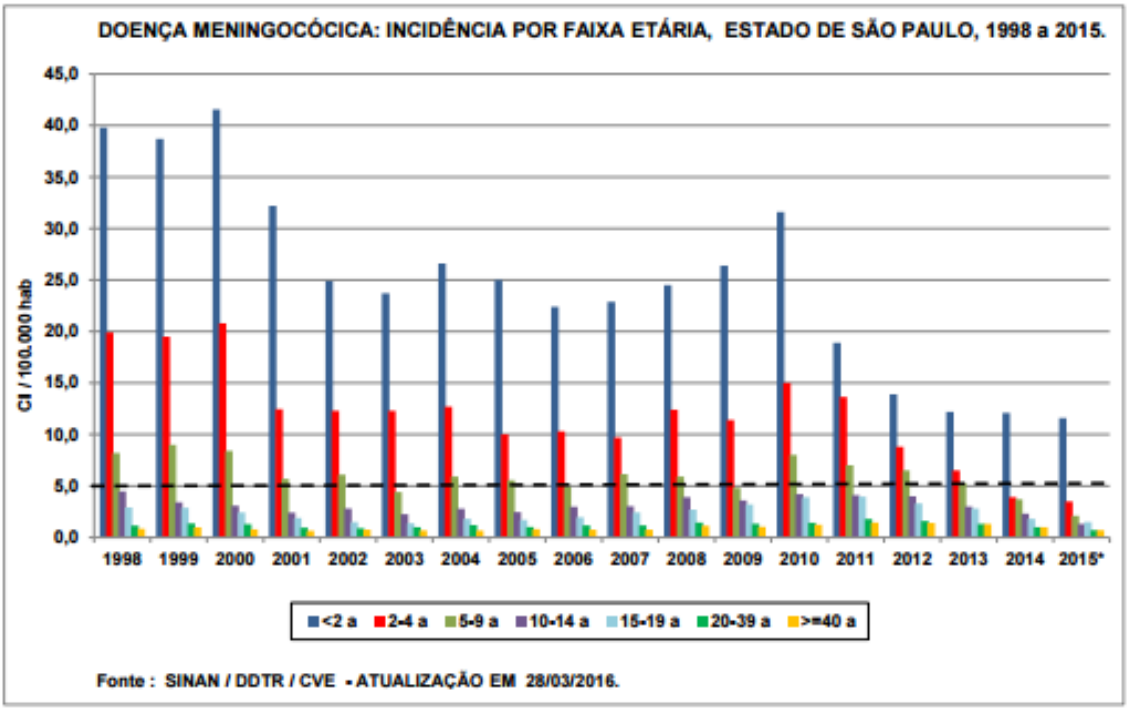
Figura 3 - Gráfico da distribuição percentual da doença meningocócica por sorogrupo no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2015.



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

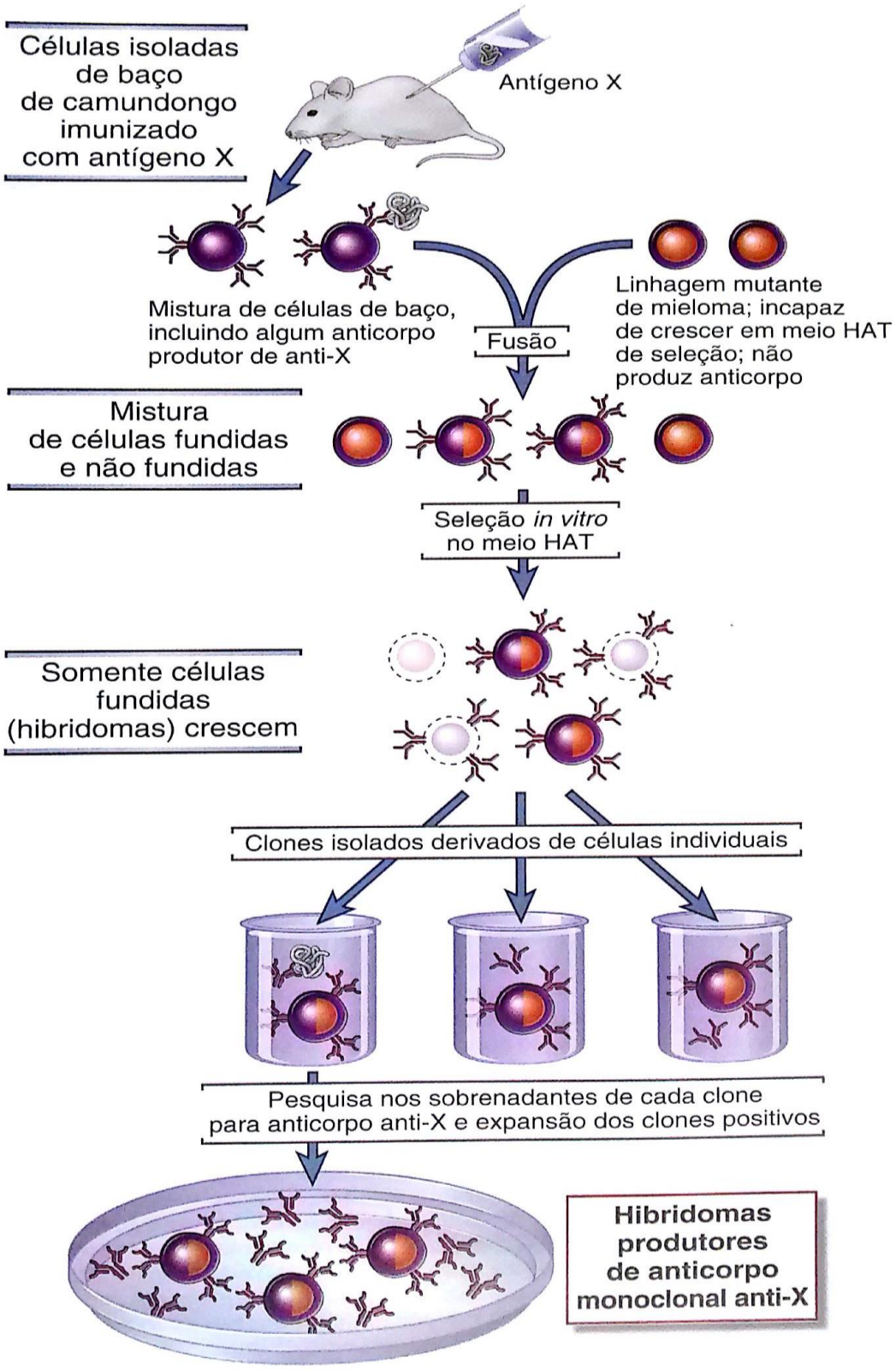
Anticorpos são proteínas circulantes que reconhecem antígenos de maneira específica e com um alto grau de afinidade. Os anticorpos são diversos e específicos, constituem os mediadores da imunidade humoral contra todas as classes de microrganismos. Dentre os anticorpos, há os policlonais e os monoclonais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

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.