



Avaliação de anticorpos monoclonais como marcadores diferenciais de meningites bacterianas e virais por meio de técnica imuno-histoquímica

Investigation on the monoclonal antibodies as differential markers for viral and bacterial meningitis by means of immunohistochemistry technique

RIALA6/1696

Thaís Regina Brienza LATARO¹, Cristina Takami KANAMURA², Cinthya dos Santos CIRQUEIRA², Sílvia D'Andretta IGLEZIAS², Elizabeth DE GASPARI^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. E-mail: egaspari@ial.sp.gov.br; degaspari.elizabeth@gmail.com

²Centro de Patologia, Núcleo de Anatomia Patológica, Laboratório de Imuno-histoquímica, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 17.11.2015 - Aceito para publicação: 16.05.2016

RESUMO

Desde 1996, o Laboratório de Anticorpos Monoclonais, Antígenos e Adjuvantes - Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (CI-IAL) tem desenvolvido trabalhos na caracterização antigênica de cepas de *Neisseria meningitidis* utilizando-se painel de anticorpos monoclonais (AcMo) pré-estabelecido, e produção de novos monoclonais para a análise de cepas com perfis desconhecidos. AcMo foram obtidos das diferentes fusões realizadas no laboratório utilizando-se células esplênicas e linfonodos poplíteos. Dois hibridomas murinos secretores de AcMo anti-*N. meningitidis* produzidos e caracterizados no CI-IAL têm sido avaliados por meio de estudo imuno-histoquímico (IHQ) no Centro de Patologia-Laboratório de Imuno-histoquímica-IAL. Com a padronização da reação, estabeleceu-se um protocolo para efetuar a pesquisa de antígenos de *N. meningitidis* por IHQ. Houve melhoria no diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não há confirmação da presença do microorganismo por técnicas biomoleculares, como PCR, utilizando-se AcMo específicos para antígenos de diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos de *N. meningitidis*. O resultado obtido nos primeiros testes mostrou-se promissor, e os dois AcMo demonstraram excelentes resultados. Não houve reatividade cruzada com meningite viral, *S. pneumoniae*, *Rickettsia* ou rubéola. Nos próximos estudos, é fundamental ampliar número de amostras, incluindo-se aquelas coletadas de pacientes com meningites meningocócicas e de indivíduos infectados com outros agentes patogênicos.

Palavras-chave. *Neisseria meningitidis*, anticorpos monoclonais, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Since 1996, the Laboratory of Monoclonal Antibodies Antigens and Adjuvants - Immunology Center of Adolfo Lutz Institute (IC-IAL) has been working on *N. meningitidis* strains antigens characterization by using a predetermined monoclonal antibodies (MoAb) panel; and the new monoclonal production has been performed for characterizing strains with unknown profiles. MoAb were obtained from different fusions performed at IAL using spleen cells and popliteal lymph nodes. Two murine hybridomas secreting MoAb anti-*N. meningitidis* antigens, produced and characterized in the Laboratory of IC-IAL, are presently being evaluated by immunohistochemical (IHC) technique at Immunohistochemistry Laboratory - Pathology Center, IAL. After standardizing these reactions, a protocol for performing investigation on *N. meningitidis* antigens by using IHQ was established. An increment in the histopathological diagnosis of meningococcal meningitis was occurred, by using MoAb specific for antigens from *N. meningitidis* serogroups, serotypes and subtypes, mainly in those cases without microorganisms confirmation by biomolecular techniques as PCR. The results obtained in these first tests proved to be promising, and two MoAb showed excellent results. No cross-reactivity with viral meningitis, *S. pneumoniae*, *Rickettsia* or Rubella was detected. For the further studies, it is fundamental to increase the samples size, including samples from patients with meningococcal meningitis and from individuals infected with other pathogens.

Keywords. *Neisseria meningitidis*, monoclonal antibodies, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

Anticorpos são conhecidos como proteínas que reconhecem antígenos de maneira específica e com alto grau de afinidade. Os anticorpos monoclonais (AcMo) surgiram da descoberta do direcionamento a um epítipo específico do antígeno, gerados em laboratório para reconhecer e se ligar a qualquer antígeno de interesse. Este método foi descrito por Georges Köhler e César Milstein e publicado em 1975¹.

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 estes têm sido desenvolvidos para alvos específicos².

Apesar de os anticorpos monoclonais serem utilizados na terapêutica médica e em investigações epidemiológicas, estes produtos têm sido muito úteis na área diagnóstica em diferentes circunstâncias².

As meningites bacterianas, principalmente as causadas pela bactéria *Neisseria meningitidis*, são exclusivas da raça humana e podem ser isoladas do material coletada de nasofaringe de um portador ou, até mesmo, desenvolver para sua forma mais grave denominada de meningococemia, resultante de quadros de septicemia fulminante com evolução fatal em poucas horas. As meningites constituem um problema global sério à saúde, que causam letalidade em níveis elevados nos países em desenvolvimento³.

Desde 1996 o Laboratório de Anticorpos Monoclonais Antígenos e Adjuvantes do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) tem desenvolvido trabalho na caracterização antigênica de cepas de *Neisseria meningitidis* empregando-se painel de AcMo pré-estabelecidos; outrossim, novos AcMo têm sido produzidos para efetuar a caracterização de perfis desconhecidos. Os AcMo foram obtidos durante as diferentes fusões realizadas no laboratório utilizando-se células esplênicas e linfonodos poplíteos⁴⁻⁶.

O Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz (NAP-IAL) realiza a técnica de imuno-histoquímica (IHQ), em sua rotina laboratorial, para o diagnóstico de doenças

neoplásicas e infecto-contagiosas; e é atualmente a referência regional e nacional para o diagnóstico de diferentes agentes infecciosos. Com o auxílio dos profissionais desse Núcleo, os AcMo desenvolvidos foram testados por meio de técnica de IHQ para avaliar suas características como marcadores diferenciais no diagnóstico de meningites bacterianas e virais^{7,8}.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Obtenção de Anticorpos monoclonais

Os AcMo utilizados foram obtidos a partir da imunização de camundongos BALB/c com preparados de antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* B. As metodologias de produção, de purificação e de caracterização dos anticorpos monoclonais empregadas na presente análise foram descritos em trabalhos anteriormente desenvolvidos e publicados pelos autores do presente estudo^{4,5,6,9,10}.

Especificidade dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais obtidos estão em fase de patente no Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) do IAL. A especificidade dos anticorpos usados é referente ao antígeno de membrana externa de *N. meningitidis*. Para a padronização, o anticorpo NM (sobrenadante de cultura de células) e o NL (ascite) foram empregados em diferentes diluições para realizar a padronização da técnica de IHQ. O anticorpo monoclonal NM foi utilizado na diluição 1/5 e o anticorpo monoclonal NL na diluição 1/2000, e as respectivas diluições apresentaram boa especificidade^{9,10} na metodologia testada.

Imuno-histoquímica

Dez amostras de tecido de cérebro foram fixadas em formol e partes desses órgãos foram

inseridos em bloco de parafina. Destas amostras em análise, quatro foram coletadas de pacientes infectados com *Neisseria meningitidis* confirmado por PCR; uma amostra de paciente com febre maculosa - *Rickettsia rickettsii* confirmado pela IHQ; quatro de indivíduos infectados por *Streptococcus pneumoniae* confirmado por PCR; e uma amostra foi obtida de paciente com rubéola confirmada pela IHQ. Os espécimes em análise foram selecionados e coletados de óbitos de pacientes encaminhados pelos Serviços de Vigilância Epidemiológica e recebidos pelo NAP-IAL.

Em estudo preliminarmente realizado, foram utilizados anticorpos monoclonais e policlonais para febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*), rubéola e *N. meningitidis*, cujas especificações estão descritas na **Tabela 1**.

Na análise destes anticorpos, os reagentes utilizados foram os seguintes: *kit* Polímero conjugado a peroxidase (Picture Max HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum DAB) da Life Technologies® e o *kit* Polímero conjugado a fosfatase alcalina (Hiddef) da Cell Marque.

As amostras foram submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos, os quais foram submetidos à coloração por hematoxilina e

eosina (HE)¹¹.

Na execução de ensaios de IHQ foi empregado o protocolo da reação, constituído de seguintes etapas: desparafinização das lâminas contendo cortes histológicos em dois banhos de xilol; re-hidratação dos cortes histológicos em banhos de álcool em diferentes concentrações e em banhos de água corrente e destilada; recuperação antigênica com a adição de digestão enzimática (proteínase K, Sigma) na concentração de 0,1 mg/mL; lavagens em água corrente, água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS 10mM, pH 7,4); adição de anticorpo primário (anticorpo policlonal ou monoclonal) em diluição previamente determinada; incubação a 4 °C em câmara úmida durante ±18 horas; lavagens de lâminas com PBS; incubação com reagente amplificador (polímeros conjugados com anti-imunoglobulinas de camundongo e enzima fosfatase alcalina), a 37 °C em câmara úmida durante 30 minutos; lavagens em PBS; etapa de revelação da reação enzimática com o substrato cromogênico Naftol-Fast Red (em que a reação positiva é visualizada pela coloração vermelha); etapa de contra-coloração com hematoxilina e montagem dos cortes histológicos com lamínula para realizar o exame microscópico.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na reação de IHQ: anticorpo para febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*), rubéola e meningite (*Neisseria meningitidis*); suas origens, espécies de animais inoculados para produção de anticorpos específicos e as respectivas diluições utilizadas na técnica de IHQ

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial de meningite meningocócica é feito por meio de cultivo de amostra de sangue ou de líquido cefalorraquidiano em meios de cultura específicos, com a finalidade de detectar a presença de *N. meningitidis*. Contudo, este método apresenta menor sensibilidade quando é realizado em amostra coletada na fase após o tratamento com antimicrobianos.

Por conseguinte, métodos alternativos para o diagnóstico de meningite meningocócica, como o PCR – Reação em cadeia de polimerase foram introduzidos no Centro de Imunologia do IAL¹², realizando-se também a detecção de antígeno específico por meio de técnicas de aglutinação anteriormente implantadas.

A técnica de IHQ para *N. meningitidis* foi desenvolvida nos Estados Unidos, conforme descrito por Guarner et al¹³. Estes autores mencionam a correlação entre o ensaio de IHQ e a técnica de real-time PCR, pois a primeira reação possibilita a detecção das bactérias, e o segundo teste proporciona melhor compreensão da infecção meningocócica. Ademais, os autores desse trabalho abordam também a correlação entre os anticorpos policlonais e monoclonais de sorogrupo específico, utilizando-se a técnica de IHQ. Outrossim, o

protocolo da técnica de IHQ utilizado pelos pesquisadores acima citados apresenta grande semelhança ao utilizado no Instituto Adolfo Lutz.

Para averiguar se seria válida sua implantação, a técnica de IHQ foi realizada seguindo-se o protocolo pré-estabelecido analisando-se 10 amostras de pacientes selecionados pelo Núcleo de Anatomia Patológica. Neste estudo foram utilizados dois anticorpos monoclonais, NM e NL, e anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis*. Os resultados desta análise estão descritos na **Tabela 2**.

Na análise de amostras provenientes de pacientes infectados por *N. meningitidis*, a ocorrência dos meningococos pode ser visualizada pela marcação nas lâminas em análise por meio de cromógeno Naftol-Fast Red, em que o resultado positivo é evidenciado pela coloração vermelha.

A **Tabela 2** aponta a positividade dos dois anticorpos monoclonais NM e NL na reação de IHQ, vista em ambas as lâminas, e as reatividades positivas foram obtidas com os anticorpos policlonais anti-*N. meningitidis*.

Resultados negativos foram detectados em amostras coletadas de pacientes com *S. pneumoniae*, quando estas foram testadas com os dois anticorpos monoclonais e com o anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis*.

Tabela 2. Avaliação da metodologia de PCR, dos anticorpos monoclonais (NL e NM) e dos anticorpos policlonais para os diferentes patógenos na análise de amostras de cérebro de óbitos enviadas ao Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz

	n.IHQ	PCR	NM	NL	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

n.IHQ – número de identificação - Laboratório de Imuno-histoquímica; PCR – reação em cadeia da polimerase; NM e NL – anticorpos monoclonais; Men – anticorpo policlonal para *Neisseria meningitidis* sorogrupo específico; Strepto – *Streptococcus pneumoniae*; poly = policlonal; + = resultado positivo; neg = resultado negativo

Nos testes realizados em lâmina de *Rickettsia rickettsii*, o anticorpo policlonal anti - *Rickettsia* demonstrou resultado positivo. No entanto, as reações foram negativas quando estas lâminas foram expostas ao anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis* e aos anticorpos monoclonais NM e NL, como mostradas na **Tabela 2**. O mesmo perfil de reatividade foi observado no teste realizado com rubéola. O ensaio apresentou o resultado positivo, quando a amostra foi testada com o anticorpo policlonal específico, porém os ensaios feitos com os dois anticorpos monoclonais foram negativos.

Estes resultados preliminares indicaram que os dois anticorpos monoclonais anti-*N. meningitidis* demonstraram excelentes resultados. Não houve reatividade cruzada com meningite viral, *S. pneumoniae*, *Rickettsia* ou rubéola.

Na literatura há citações em que as diferenças entre as duas categorias de anticorpos estão bem caracterizadas. O anticorpo policlonal é reconhecido pelos múltiplos epítomos de um mesmo antígeno, enquanto o anticorpo monoclonal exibe reatividade exclusiva para um único epítomo do produto antigênico, o que resulta em alta especificidade e afinidade. Por conseguinte, os anticorpos monoclonais produzidos no presente estudo, mostraram resultados promissores na reação de IHQ, quando comparados ao anticorpo policlonal.

A técnica de IHQ apresenta vantagens por ser um ensaio rápido, e é adequada para ser empregada em trabalhos de rotina diagnóstica, em situações em que há suspeita de doença meningocócica, principalmente na análise de amostras *post-mortem* de cérebros ou de órgão suprarrenal e, ainda, como subsídio em estudos retrospectivos.

As técnicas de IHQ possibilitam a detecção das bactérias e de seus antígenos, com a vantagem de preservar as características morfológicas do tecido. Este fato propicia o desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos patogênicos em amostras de tecidos humanos, cujos dados auxiliam na validação dos achados observados em estudos *in vitro*. No caso da bactéria *N. meningitidis*, reservatório natural nos tecidos humanos, esta técnica é utilizada para melhor compreender a doença meningocócica¹⁴.

A técnica de IHQ, empregada na análise de amostras de tecido fixadas em formol e inseridas em blocos de parafina, apresenta várias vantagens: (i) como ferramenta diagnóstica específica de infecção por *N meningitidis*; (ii) preservação das características morfológicas do tecido em análise, o que possibilita a localização dos meningococos em células específicas; (iii) fornecimento de registro permanente da amostra biológica específica preservada em bloco de parafina e em forma de cortes histológicos fixados em lâminas, bem como por representar risco biológico mínimo para os profissionais de laboratório que manuseiam esse tipo de material¹¹.

Executar a padronização da técnica de IHQ para diagnóstico de *N. meningitidis* com o emprego de anticorpos monoclonais de reatividade cruzada entre os diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos desta bactéria foi o objetivo deste estudo com o intuito de estabelecer um protocolo para ser validado e implantado. O laboratório do NAP - Centro de Patologia do IAL realizou o ensaio de IHQ para avaliar a sensibilidade, especificidade e demais propriedades de dois anticorpos monoclonais anti-*N. meningitidis* desenvolvidos no Laboratório de Anticorpos Monoclonais Antígenos e Adjuvantes - Centro de Imunologia-IAL. Os dois anticorpos monoclonais foram aplicados em cortes histológicos de amostras *post-mortem* de cérebro de paciente com meningite meningocócica, meningite de etiologia viral e em tecido cerebral sem alterações patológicas. A reatividade positiva foi detectada somente nas amostras de cérebro de pacientes com diagnóstico de meningite meningocócica confirmado pela técnica de PCR.

A metodologia de real-time PCR (RT-PCR) foi introduzida na rotina do Centro de Imunologia do IAL no ano de 2011, após sua validação para diagnosticar bactérias causadoras de meningite: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Nesse trabalho de validação, foi demonstrada alta sensibilidade e especificidade da metodologia, quando o PCR foi feito na amostra de líquido cefalorraquidiano, e quando o resultado obtido foi comparado com a cultura em meio específico cujo resultado foi negativo. A sensibilidade observada para as

bactérias *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* foi alta, em torno de 90 %. Por conseguinte, o uso de técnica de RT-PCR para o diagnóstico de bactérias meningocócicas foi incorporado ao serviço de saúde pública e para ser utilizado como teste laboratorial alternativo ou mesmo de referência para comparar ou confirmar os resultados obtidos no ensaio de IHQ¹².

Na execução do presente estudo, foi feito o levantamento epidemiológico de amostras de óbito, que foram encaminhadas para análise no Núcleo de Anatomia Patológica do IAL, no período de 2009 a 2015, correlacionando-se os dados contidos nos respectivos boletins médicos: idade, localização, suspeita clínica e resultado do diagnóstico histopatológico.

Concluída a padronização dos ensaios acima citados, planeja-se o estabelecimento de um protocolo de técnica de IHQ para efetuar a pesquisa de antígenos de *N. meningitidis*. O propósito desse estudo é de incrementar o diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não há confirmação da presença do agente etiológico por meio de técnicas biomoleculares, como PCR, empregando-se anticorpos monoclonais específicos para antígenos presentes em diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos de *N. meningitidis*.

Outrossim, posteriores estudos serão conduzidos para analisar número significativo de amostras, com o intuito de efetuar a validação dos anticorpos monoclonais anti-*N. meningitidis* produzidos.

CONCLUSÃO

O resultado obtido nos primeiros testes realizados no presente trabalho mostrou-se muito promissor, contudo será dada continuidade a este estudo ampliando-se o número de amostras biológicas coletadas de pacientes com meningites meningocócicas e com outras patologias. Ademais, a metodologia com o uso dos dois anticorpos monoclonais produzidos no Centro de Imunologia – IAL está atualmente em fase de validação no Núcleo de Anatomia Patológica – IAL.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos 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 Uttagawa, diretora do Núcleo de Anatomia Patológica, pelo apoio ao nosso estudo. À Dra Rosecelis Araújo Brasil, médica Patologista, pelo apoio técnico científico na aplicação da técnica de imuno-histoquímica no trabalho. A Júlia de Carvalho e a Silvana de Mello Pereira da Silva do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos apoios técnicos ao projeto. A CAPES pela bolsa de estudos oferecida à aluna do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

FINANCIAMENTO DA PESQUISA

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Adolfo Lutz e teve o apoio parcial da FAPESP Processo 12/15568-0. O trabalho faz parte da tese de Mestrado da aluna Thaís Regina Brienza Lataro, vinculada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari.

REFERÊNCIAS

1. Köhler G, Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495-7.
2. Cordeiro MLS, Silva NLF, Vaz MRF, Nóbrega FFF. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. *Rev Saúde Ciência On line*. 2014;3(3):252-2.
3. Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 2:B51-63.[DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.063].

4. 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*. 2001;5(3):143-53. [DOI: 10.1590/S1413-86702001000300007].
5. Belo EF, Ferraz AS, Coutinho LM, Oliveira AP, Carmo AM, Tunes CF, 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 São Paulo, Brazil. *Hybridoma*. 2007;26(5):302-10. [DOI: 10.1089/hyb.2007.0508].
6. Belo EF, Coutinho LM, Ferraz AS, De Gaspari EN. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of *Neisseria meningitidis* and the distribution of this subtype in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(6):407-18. [DOI: 10.1590/S1413-86702004000600004].
7. Jay JI, Brunhoeber PS, Smith MH, Williams RR, Sugarman MC, Free HL, et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). *Histopathol*. 2013;62(4):563-77. [DOI: 10.1111/his.12024].
8. Böger C, Kalthoff H, Goodman SL, Röcken C. Validation and comparison of anti- $\alpha v \beta 3$ and anti- $\alpha v \beta 5$ rabbit monoclonal versus murine monoclonal antibodies in four different tumor entities. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21(6):553-60. [DOI: 10.1097/PAI.0b013e318284a03a].
9. Chaves LB, Achkar SM, Silva Ade C, Caporale GM, Cruz PS, Batista AM, et al. Monoclonal antibodies for characterization of rabies virus isolated from non-hematophagous bats in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(11):1238-49. [DOI: 10.3855/jidc.6959].
10. Ferraz AS, Belo EF, Coutinho LM, Oliveira AP, Carmo AM, Franco DL, 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*. 2008;8:30. [DOI: 10.1186/1471-2334-8-30].
11. Alves VAF. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1999, 1-9.
12. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitidis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(6):e20675. [DOI: 10.1371/journal.pone.0020675].
13. Guarner J, Greer PW, Whitney A, Shieh WJ, Fischer M, White EH, et al. Pathogenesis and Diagnosis of Human Meningococcal Disease Using Immunohistochemical and PCR Assays. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(5):754-64. [DOI: 10.1309/3489075U03LMK9AE].
14. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal Disease. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1378-88. [DOI:10.1056/NEJM200105033441807].