Zika, Chikungunya, Dengue e Febre Amarela: Protocolos para Imuno-Histoquímica

Luiz Claudio Ferreira

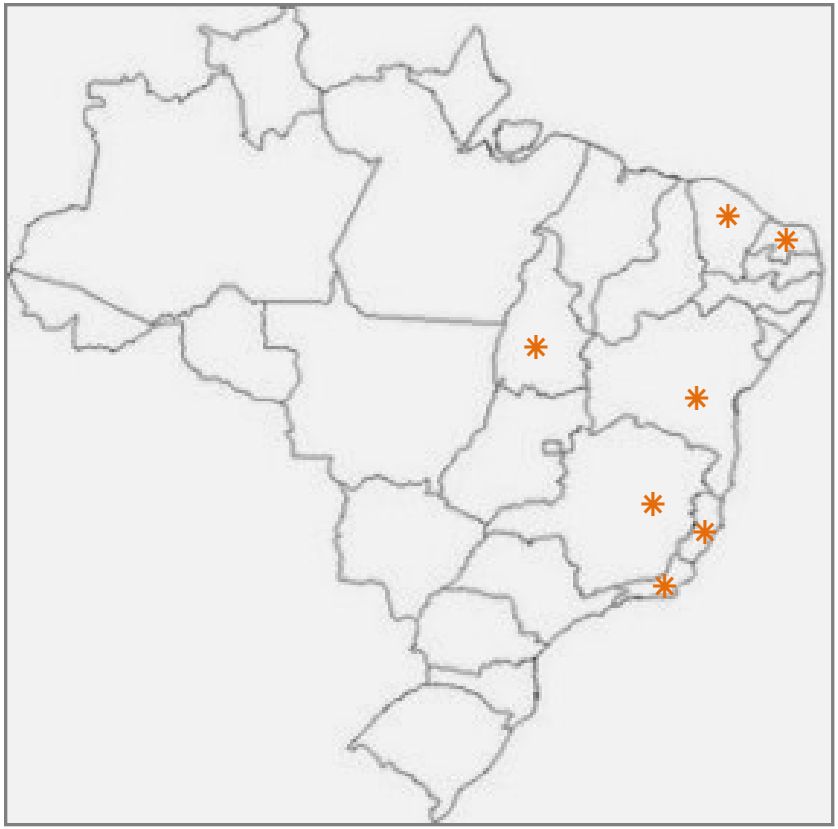
História

- Origem: Albert H. Coons e seus colaboradores na década de 40, com a imunofluorescência;

- Introdução de marcadores enzimáticos: a primeira enzima a ser utilizada foi a peroxidase de rábano, seguida por fosfatase alcalina, a glicose-oxidase e a beta-D-galactosidase;

- No início os anos 90 os sistemas de detecção sensíveis começaram a ser aplicados em anatomia patológica.

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



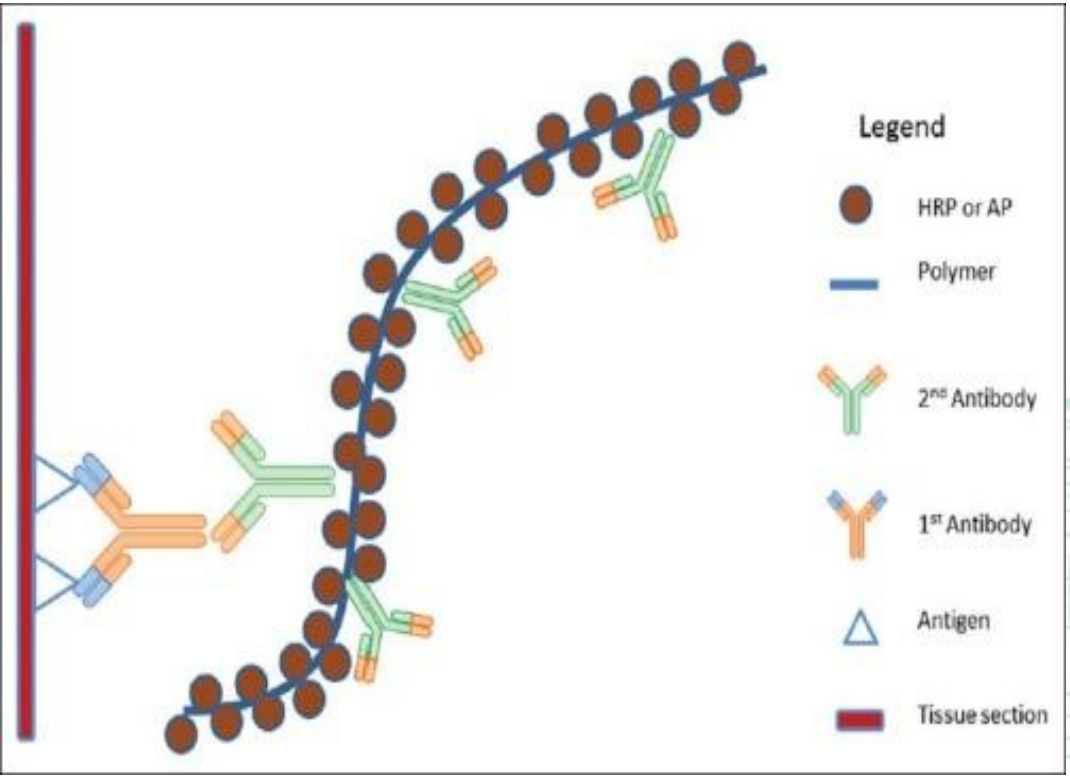
Imuno-Histoquímica no Diagnóstico de Arboviroses

Na ocorrência do óbito por suspeita de infecção por arbovirose, destaca-se a importância da realização do diagnóstico histopatológico (presuntivo) seguido de pesquisa de antígenos virais por imuno-histoquímica (confirmatório), visto que lesões anatomopatológicas determinam as alterações relativas aos óbitos por cada doença.

Imuno-Histoquímica

Utiliza de anticorpos para detecção de antígenos em amostras teciduais ou celulares (imunocitoquímica), reunindo conhecimentos próprios da imunologia, histologia e química.

Fonte:
INI/Fiocruz



Fonte: Shi Z, Stack M S. An Update on Immunohistochemistry in Translational Cancer Research. Cancer Transl Med 2015;1:115-22

Imuno-Histoquímica

Etapas da Reação de Imuno-Histoquímica

- Desparafinização e Hidratação
- Recuperação Antigênica
- Bloqueio de Proteínas Endógenas
- Incubação com o Anticorpo Primário
- Incubação com o Sistema de Amplificação (ou Anticorpo Secundário)
- Revelação
- Contra-coloração e Selagem.

Desparafinização

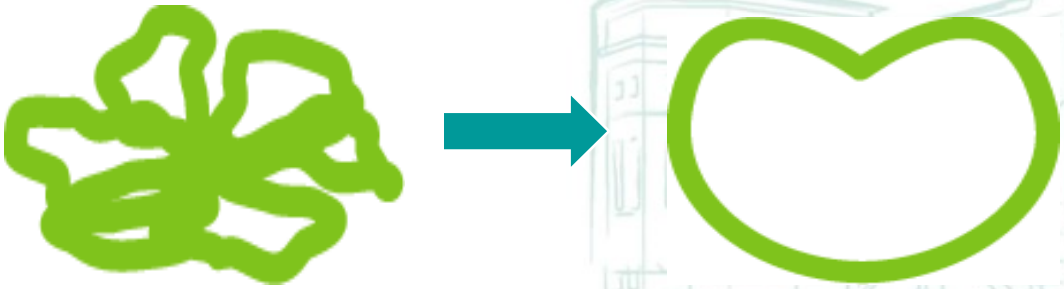
- Com o objetivo de retirar a parafina impregnada no tecido: colocar as lâminas na estufa a 60ºC por 30 min, para aderência dos cortes e passar em 3 banhos de xilol para a retirada da parafina.

Hidratação

- Para reidratar o tecido: passar as lâminas em três banhos graduais no álcool etílico absoluto (100%), 95% e 70% e depois transferindo para a água.

Efeito da Fixação nas Proteínas

Função do Pré-Tratamento



Recuperação Antigênica

Recuperação Antigênica para Zika

Diluição do Tampão de EDTA (pH 8,0)

Recuperação Antigênica Por Pressão 110ºC por 15 min

Recuperação Antigênica para Chikungunya

Diluição do Tampão de EDTA (pH 8,0)

Recuperação Antigênica Por Pressão 110ºC por 15 min

Recuperação Antigênica para Dengue

Diluição do Tampão de Citrato (pH 6,0) 1:10

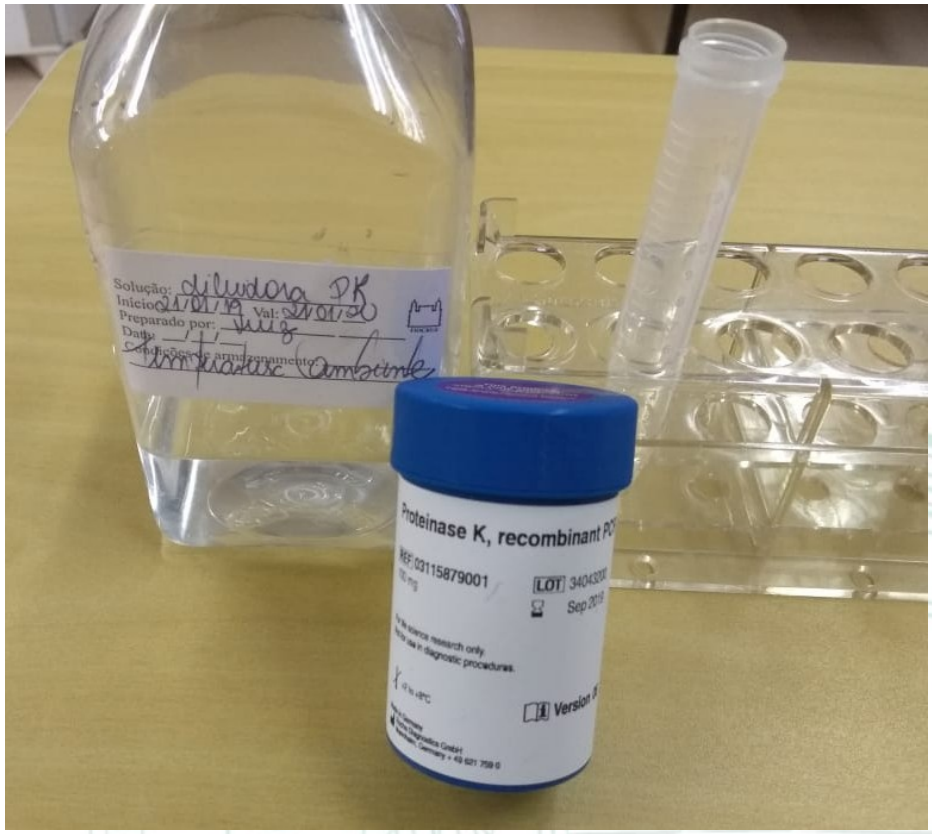
Recuperação Antigênica Por Pressão 110ºC por 15 min

Dupla Recuperação Antigênica para Febre Amarela

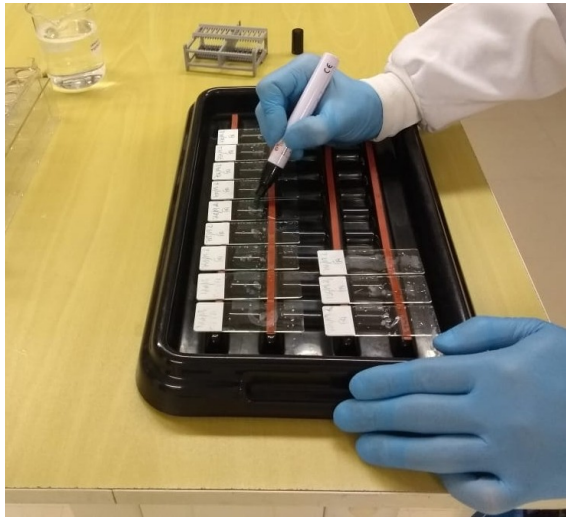
Diluição do Tampão de EDTA (pH 6,0) 1:10

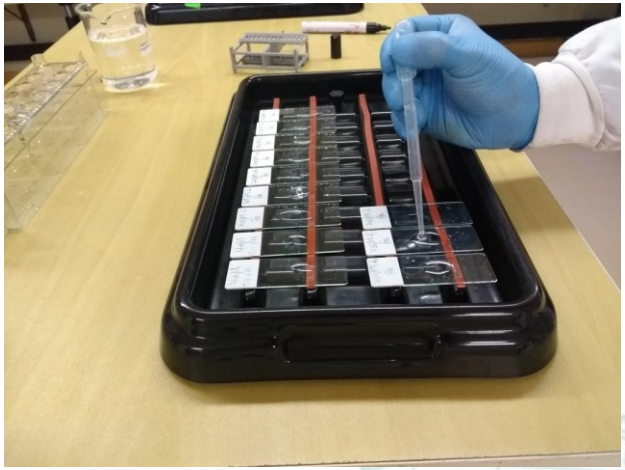
Recuperação Antigênica Por Pressão
95ºC por 30 min

Diluição da Proteinase K 1:200

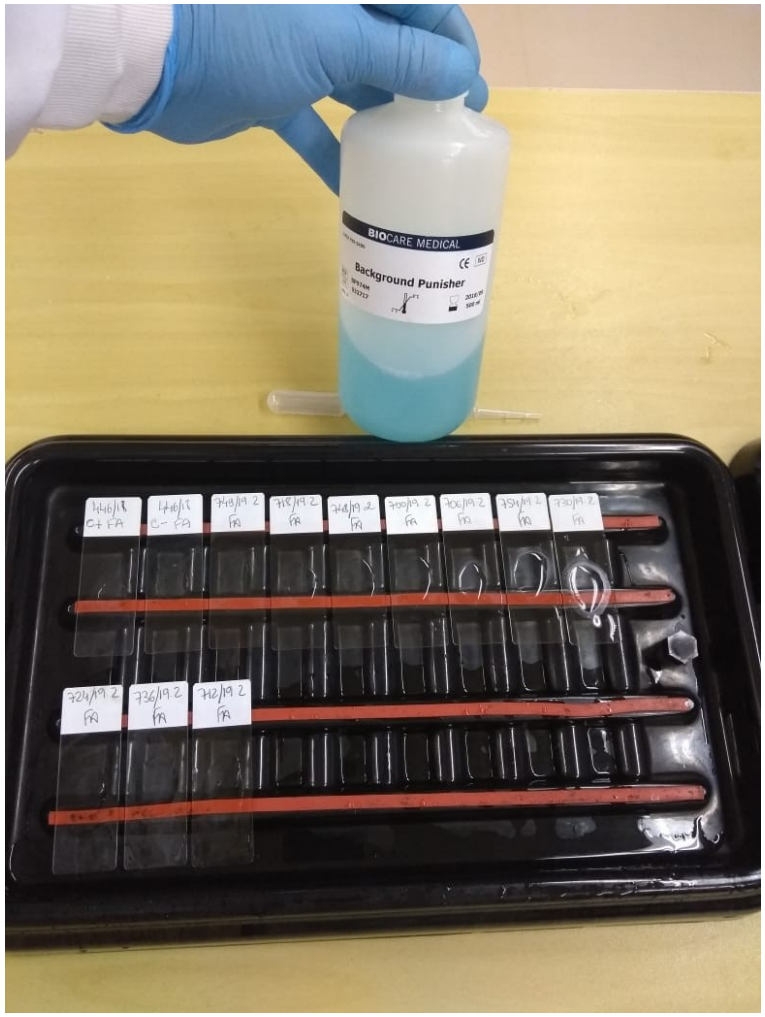


Recuperação Antigênica Por Digestão Enzimática durante 15 min





Bloqueio de Ligações Inespecíficas



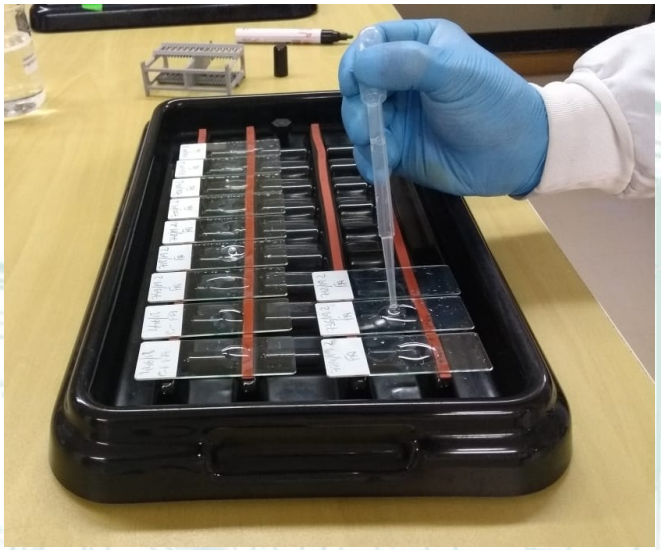
- Para bloquear a fosfatase: incubar o tecido com 100uL de solução bloqueadora de background *(Background Punisher)* por 10 minutos;

Incubação com o Anticorpo

- Para a ligação antígeno-anticorpo: Colocar 100uL do anticorpo primário diluído e incubar *overnight* em câmara úmida de 2°C a 8°C;

DILUIÇÕES:

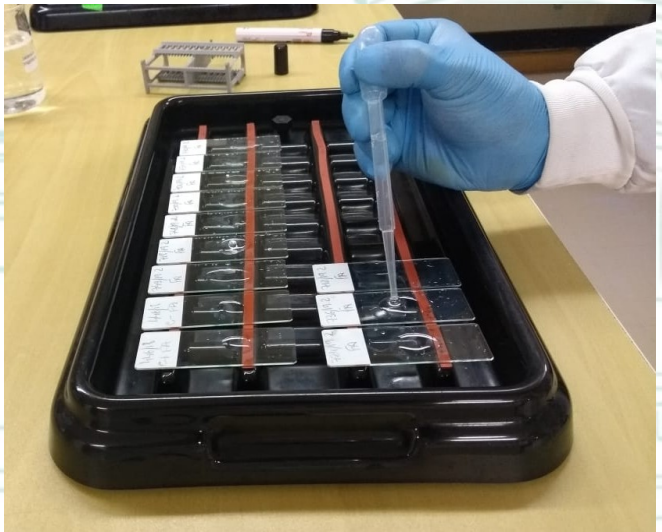
- Zika-
- 1:2000
- Chikungunya-
- 1:10.000
- Dengue -
- 1:2000
- Febre Amarela -
- 1:40.000



Amplificação com Kit AP

- Sistemas de detecção de polímero AP

- Lavar as lâminas 2 vezes com solução TBS.



Amplificação com Kit

- Colocar 100uL do polímero *AP-Polymer* e incubar o tecido por 15 minutos;
- Lavar as lâminas 2 vezes com solução TBS.

OBS: Caso o anticorpo primário seja produzido em coelho, omita a etapa de incubação com o anticorpo prob e deixe o tecido ficar incubando apenas com o polímero por 30 minutos.

Revelação

- Colocar 100uL do cromógeno **(FAST RED)** e deixar as lâminas incubando por 20 minutos a temperatura ambiente;
- Lavar as lâminas 2 vezes com água destilada.

NOTA: Preparo da solução – Colocar 01 pílula do cromógeno para cada 5 mL da solução tampão específica. O volume final a ser preparado irá depender do número de lâminas utilizadas na reação.

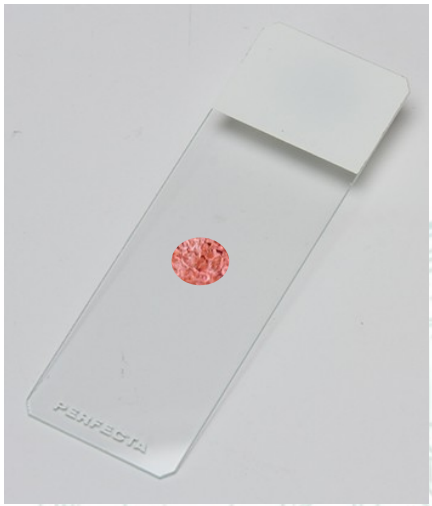
Contra Coloração

- Colocar as lâminas num suporte para coloração e imergir as mesmas em hematoxilina modificada de Mayer por 2 minutos retirar excesso em água destilada e colocar por 1 minuto no lítio blu, lavar por 5 minutos em agua destilda.

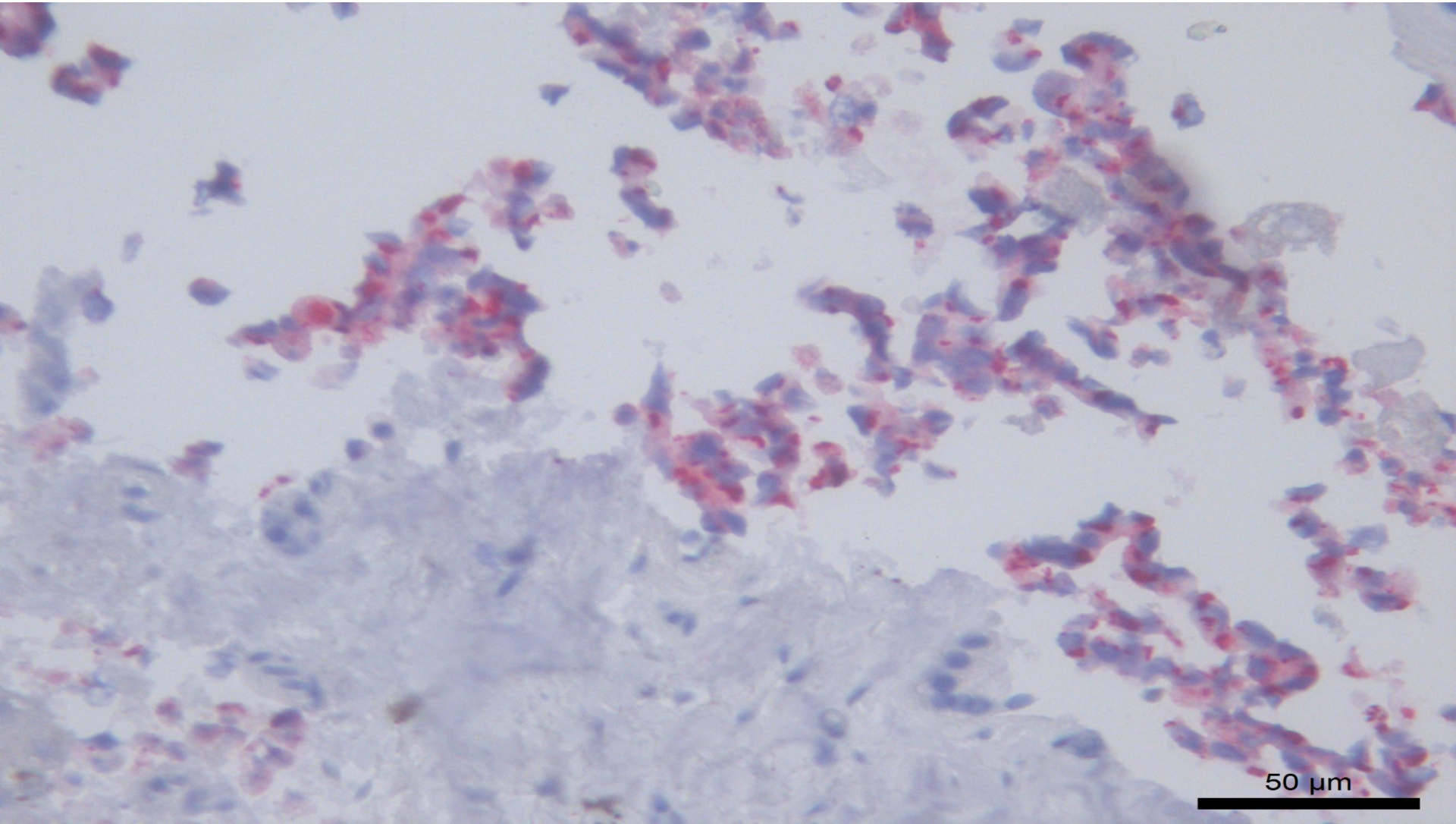
Selagem

- Deixe o tecido secar em estufa a 60ºC por 5 minutos;

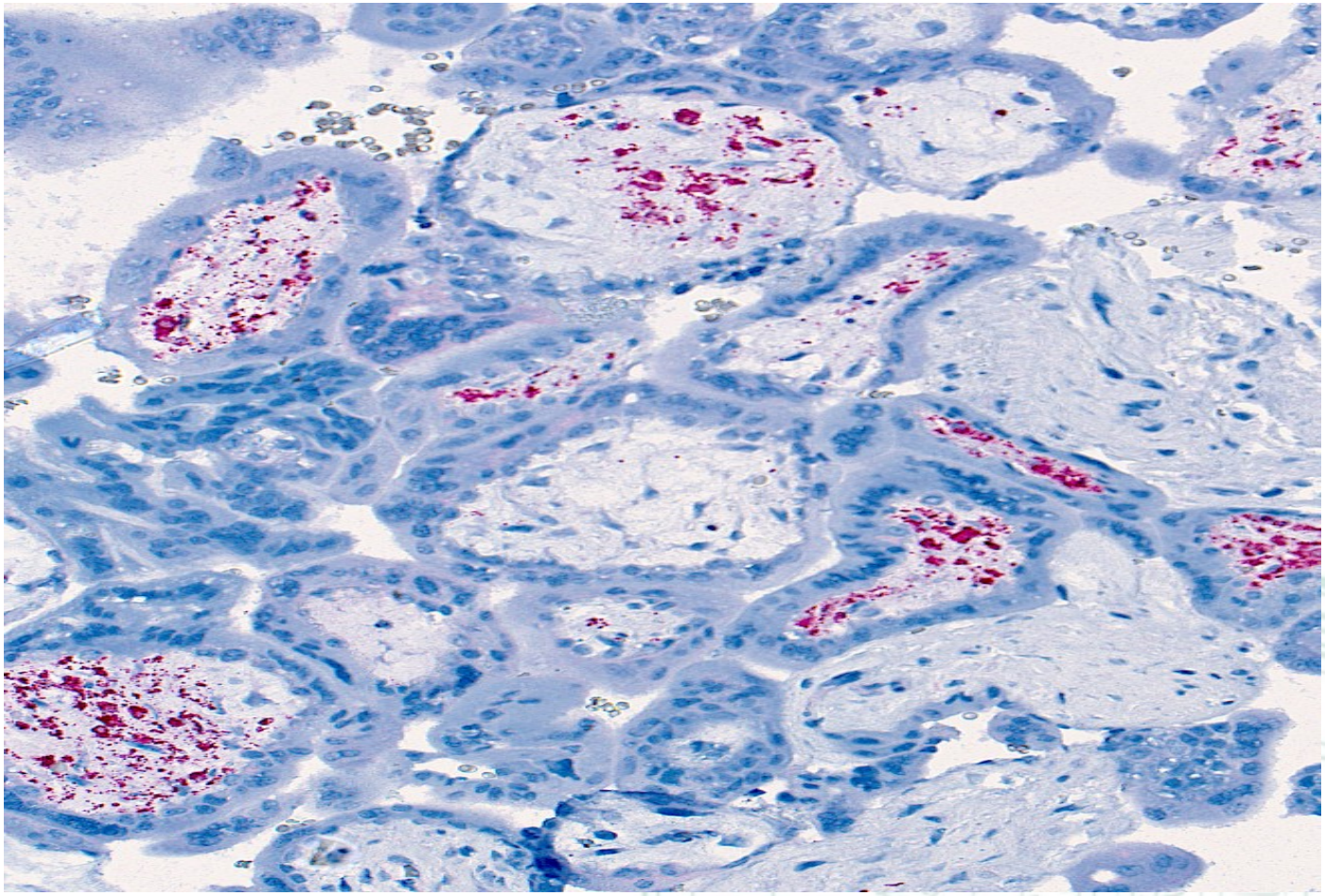
- Montar as lâminas utilizando meio de montagem aquoso.



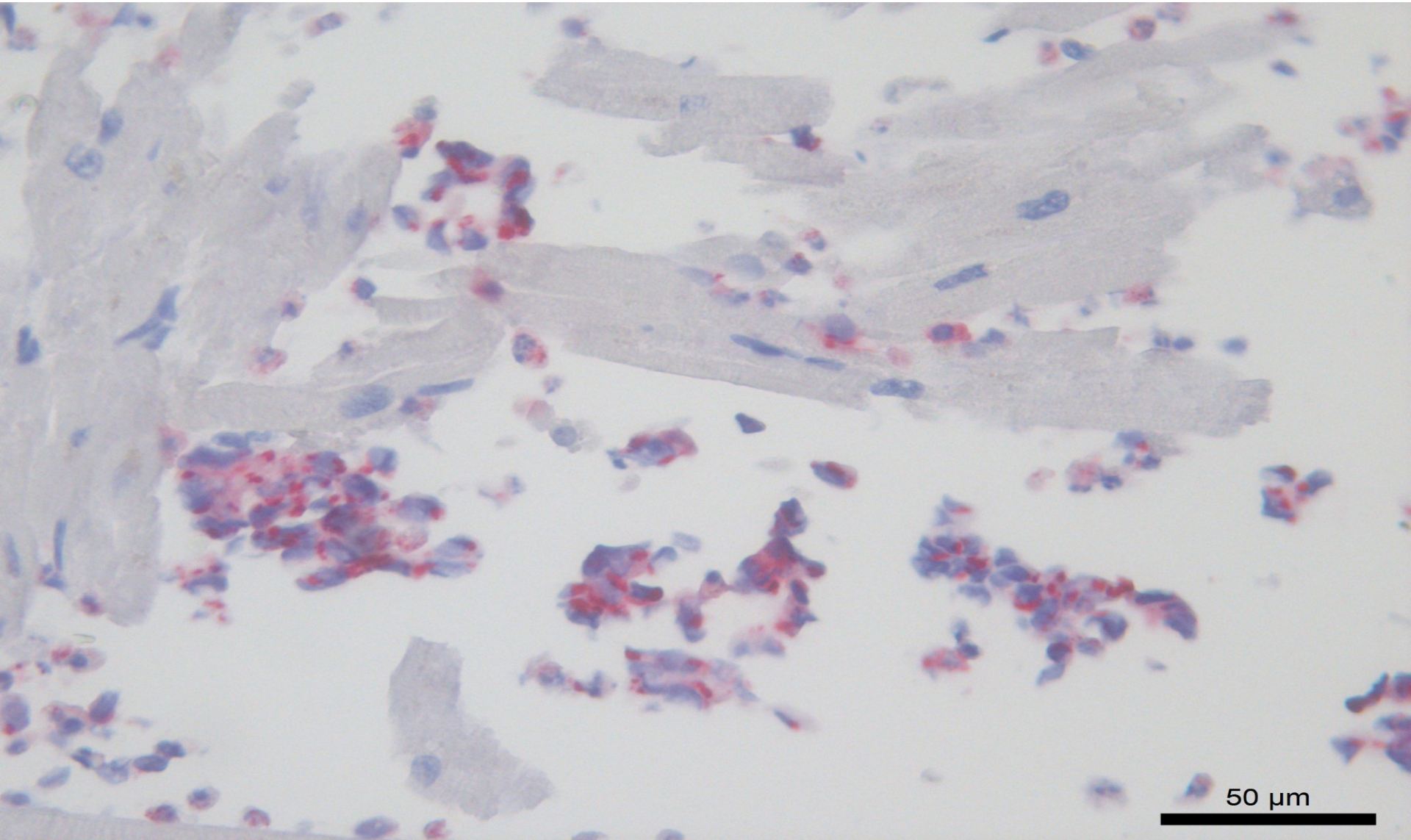
Resultado Zika Vírus



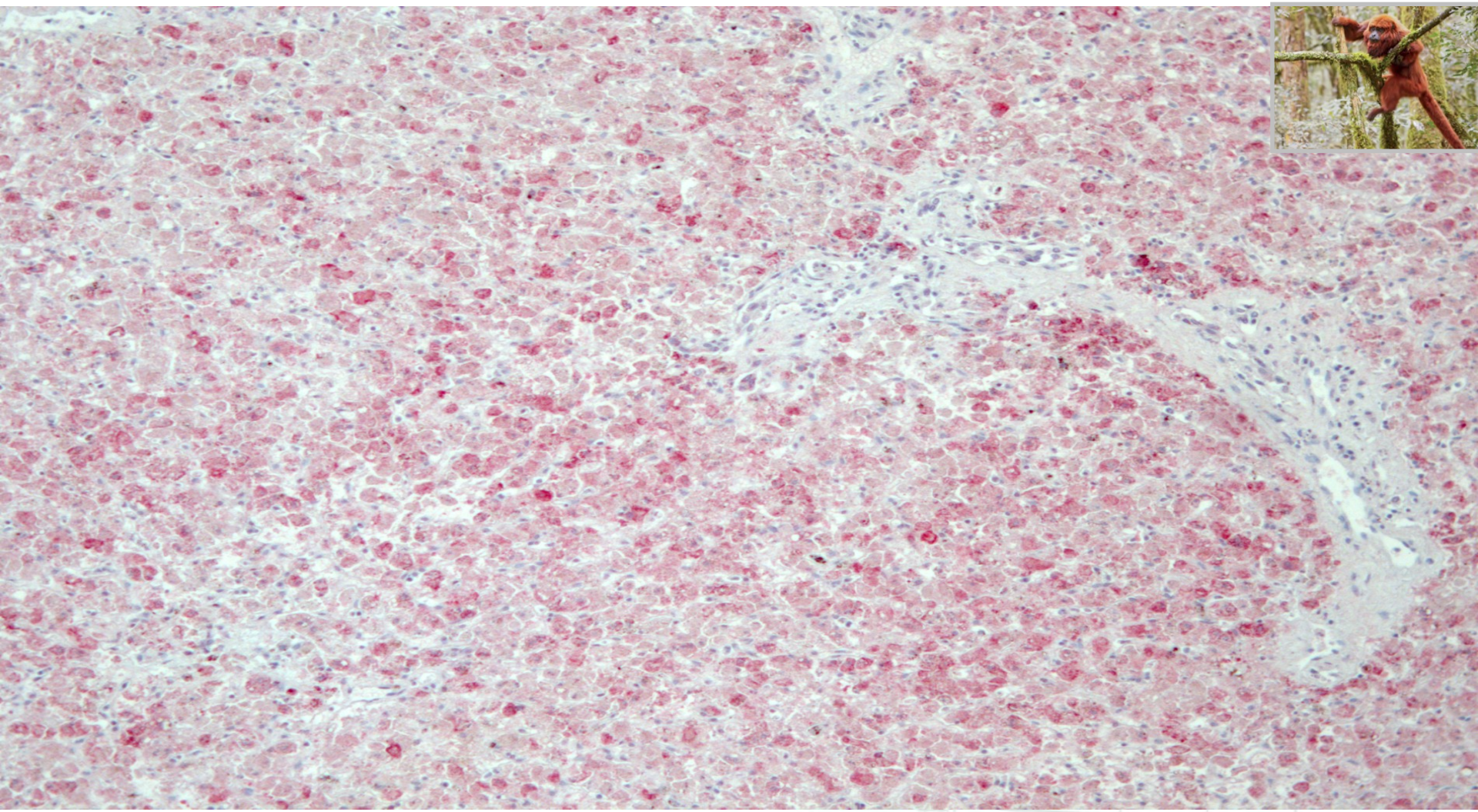
Resultado Zika Vírus



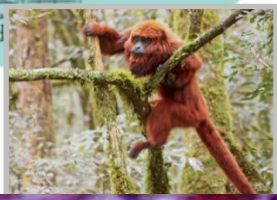
Resultado Zika Vírus

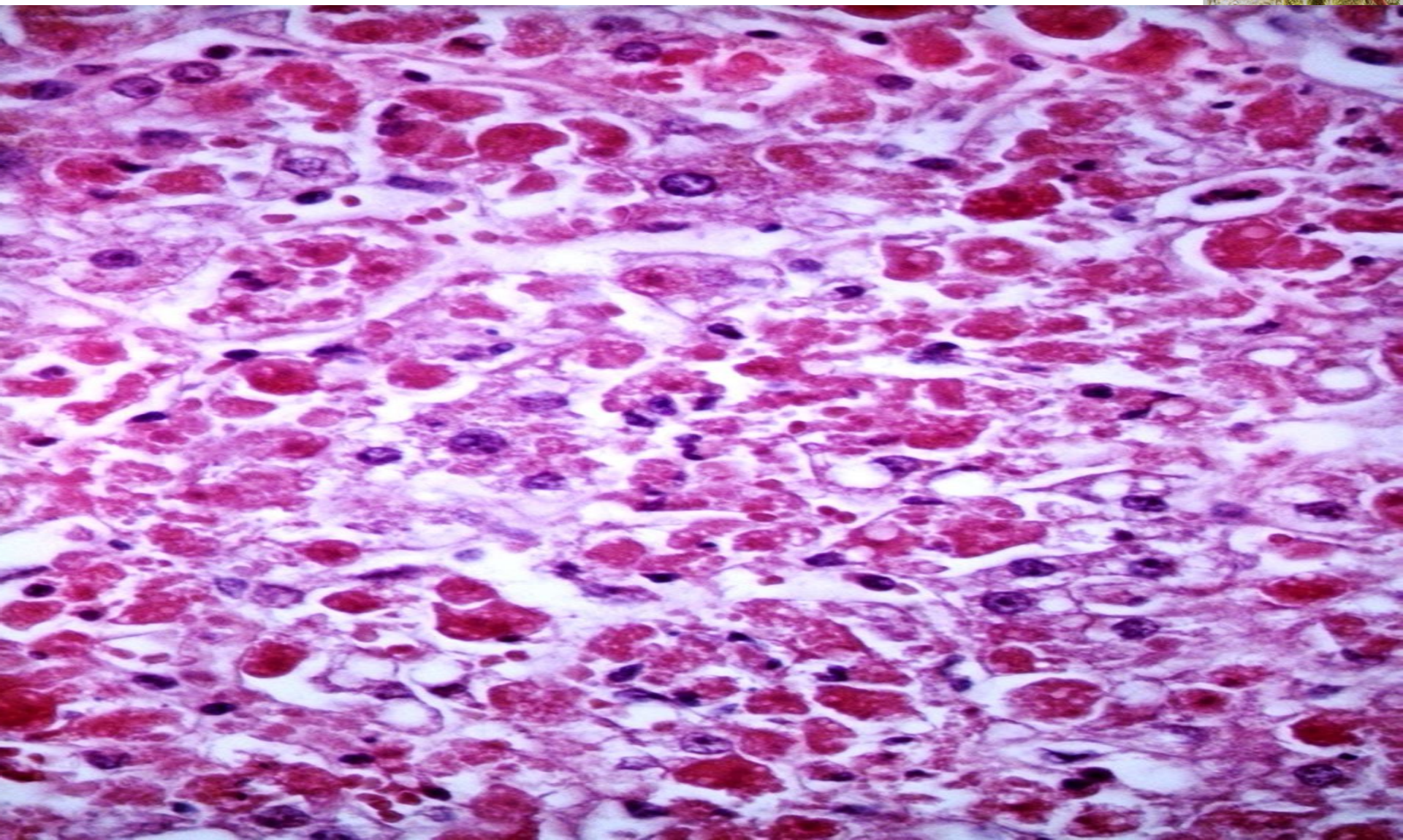


Resultado Febre Amarela

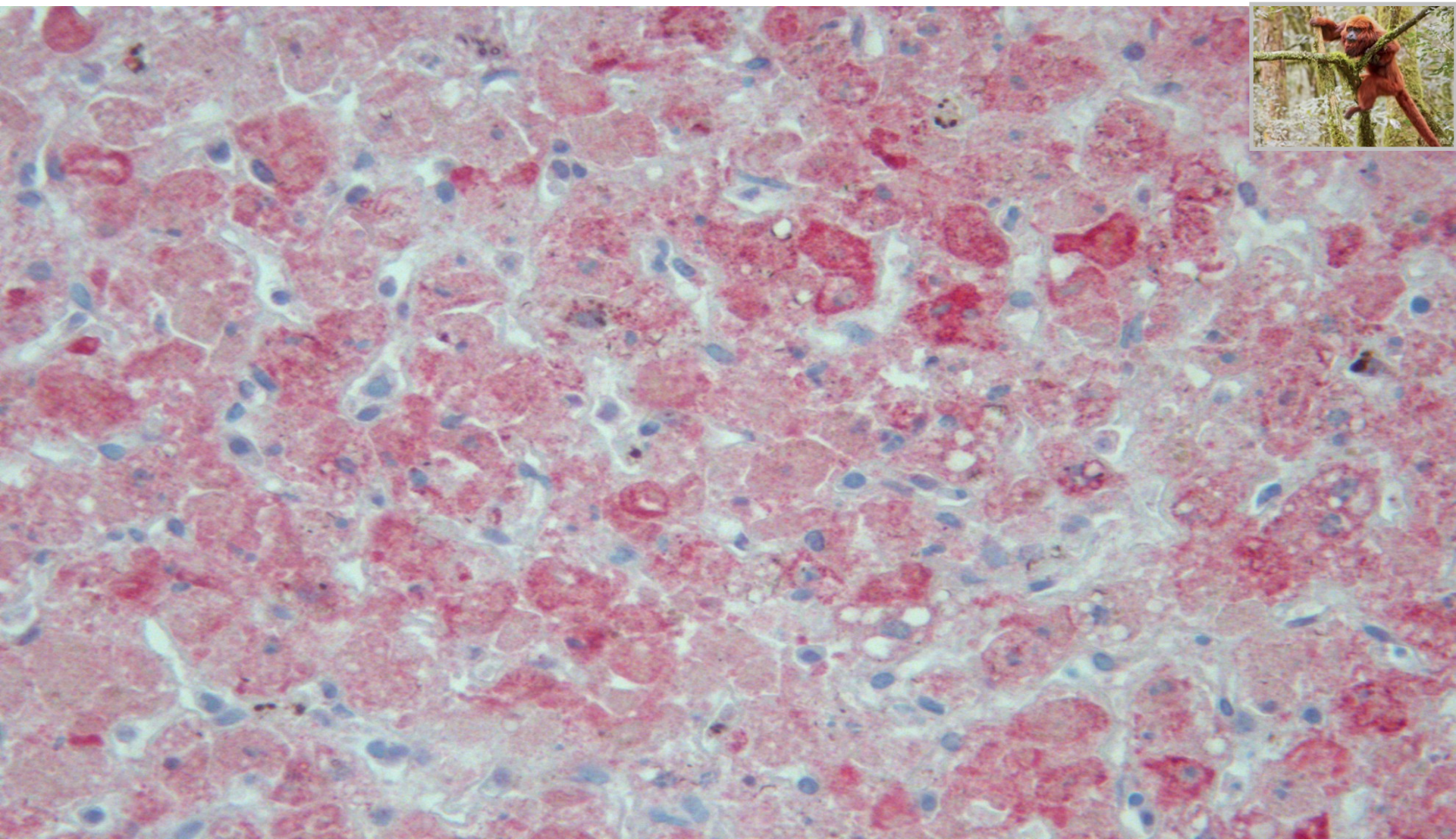


Resultado Febre Amarela

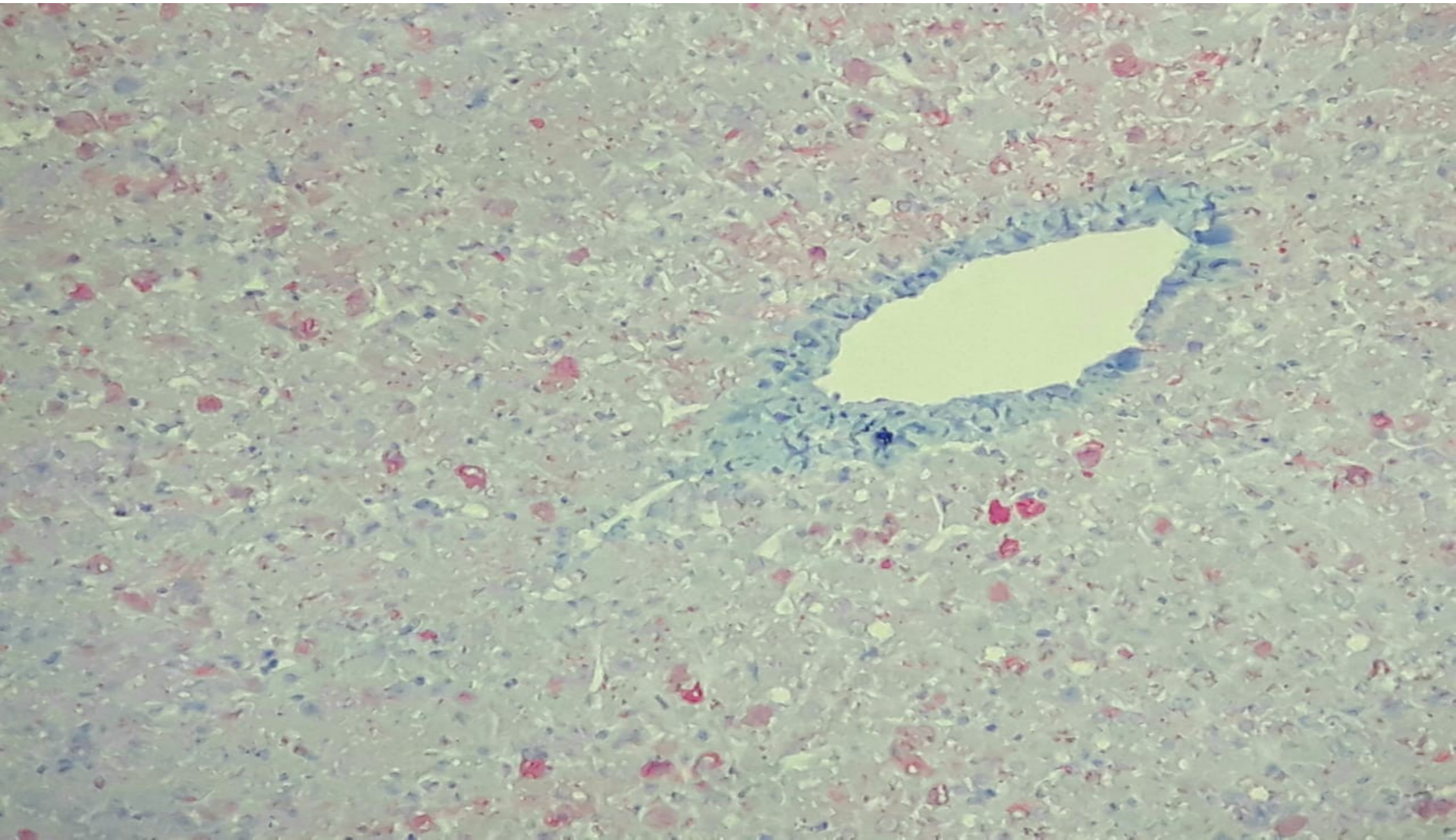




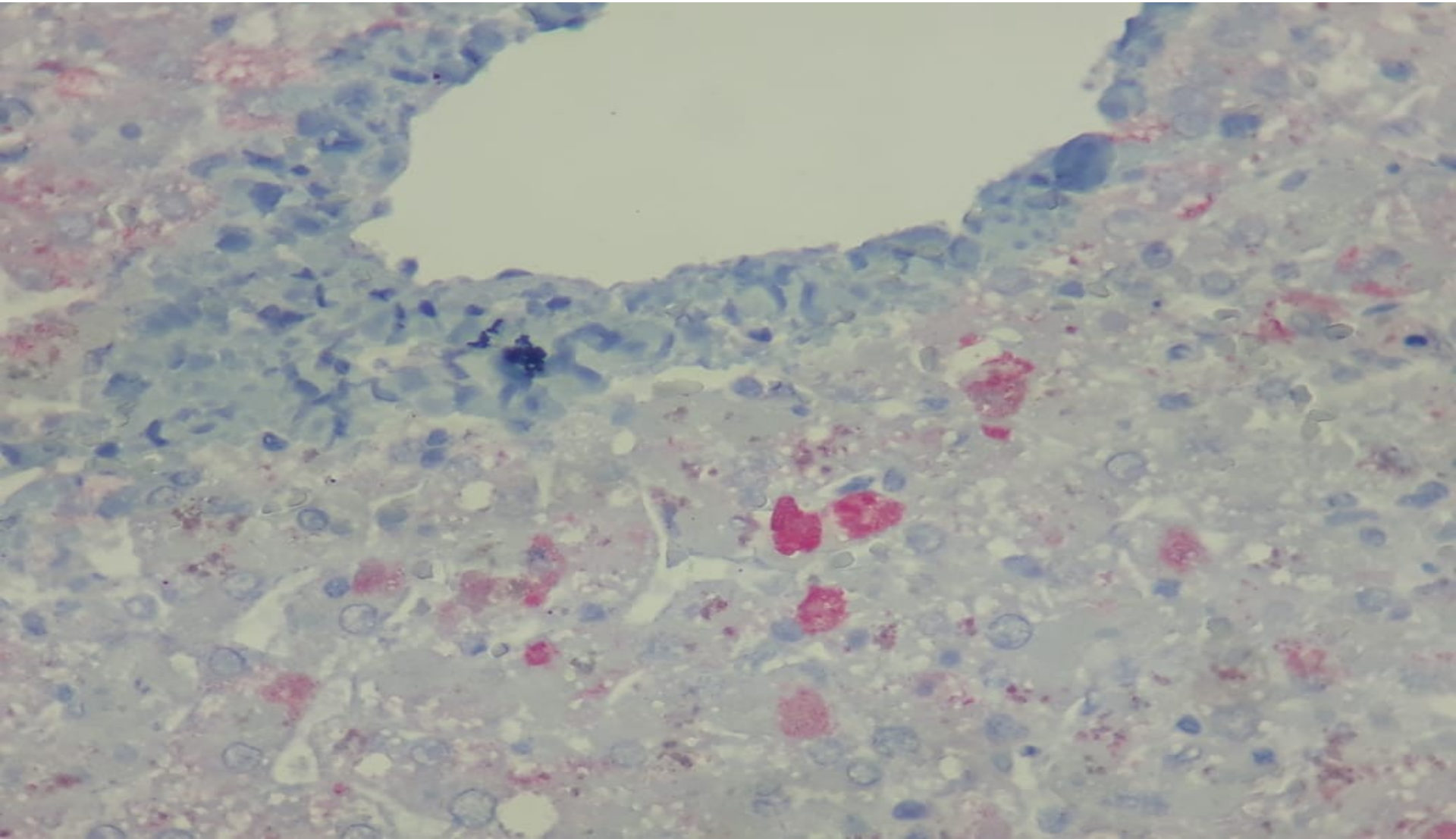
Resultado Febre Amarela



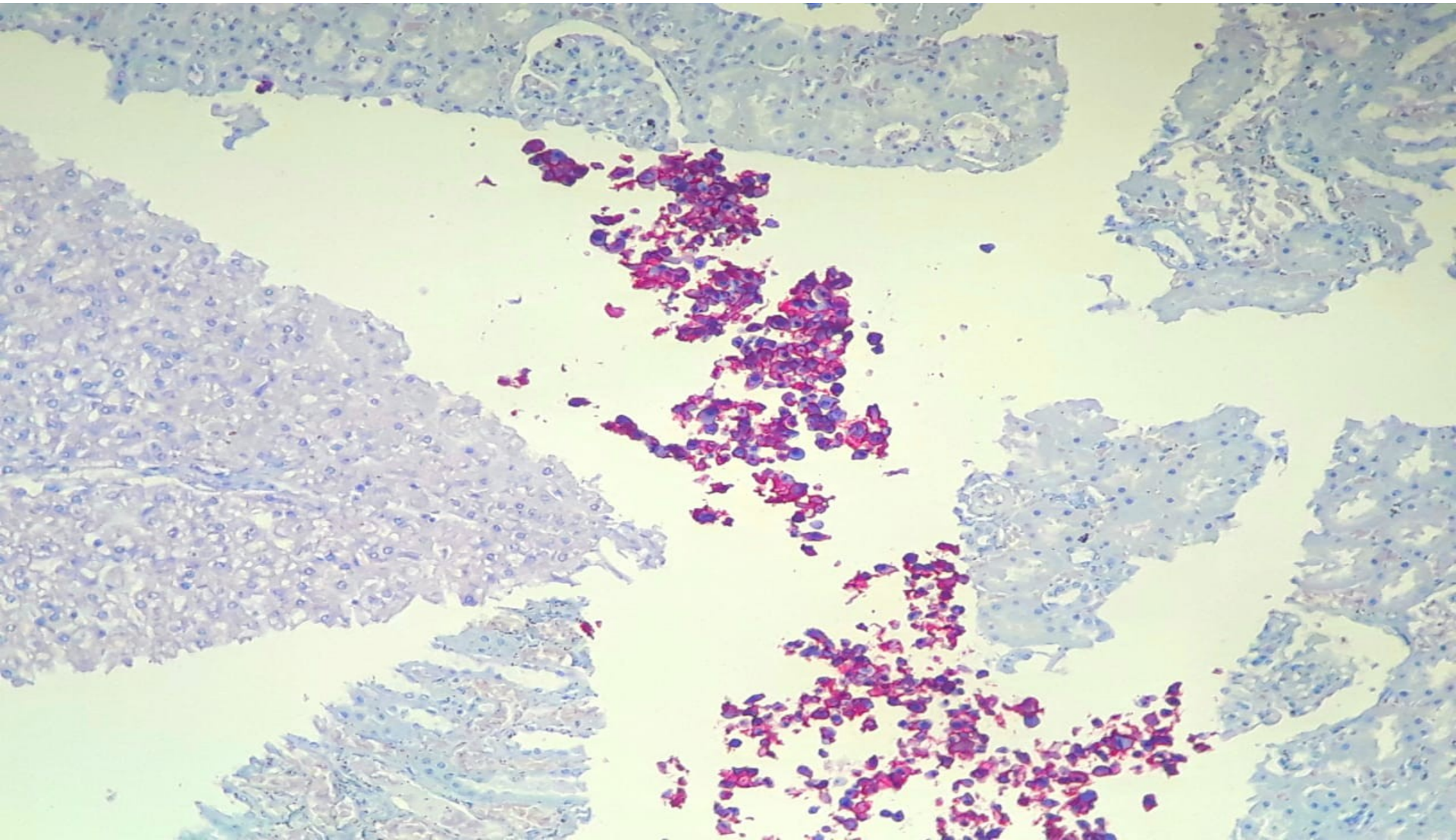
Resultado Febre Amarela x Humano



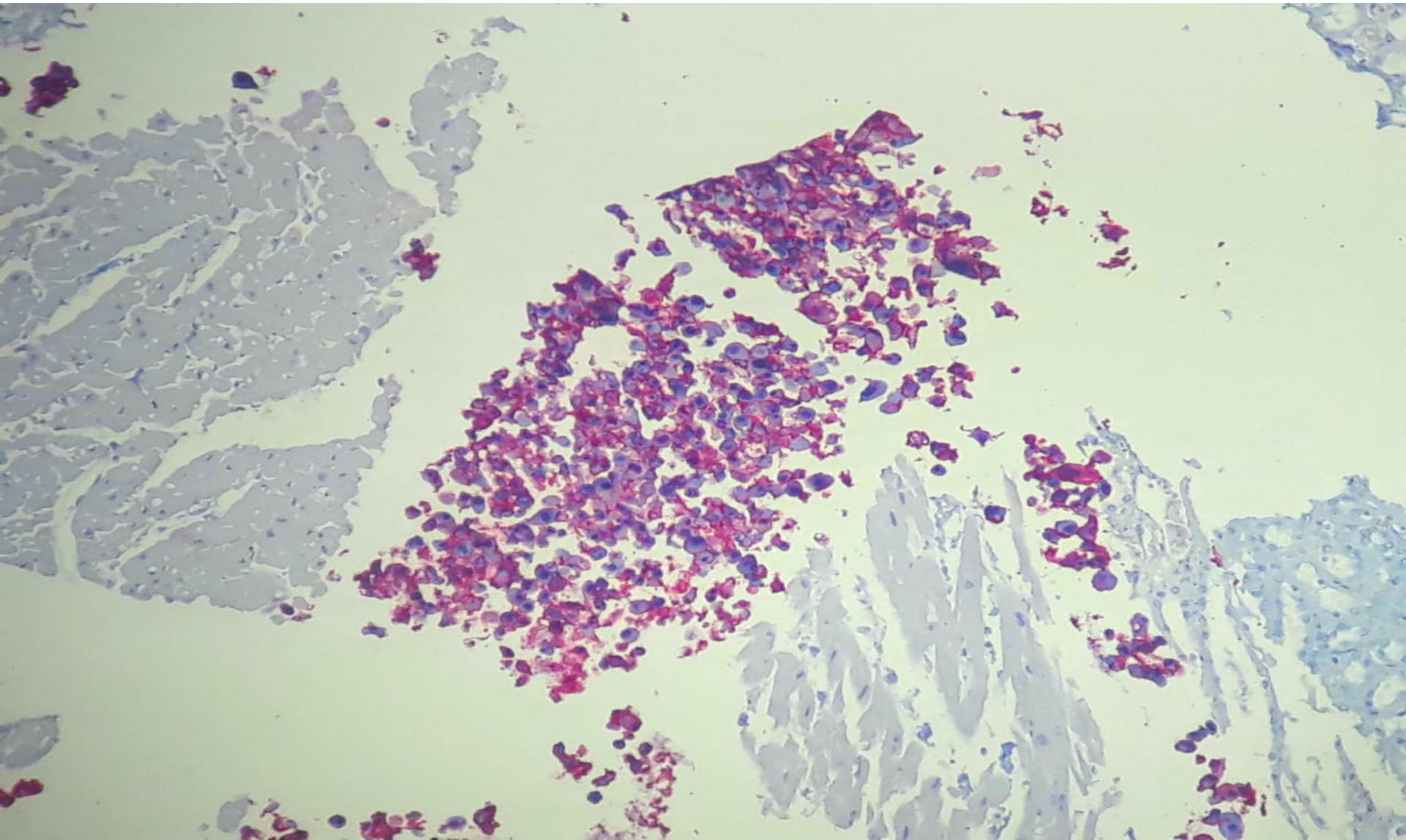
Resultado Febre Amarela x Humano



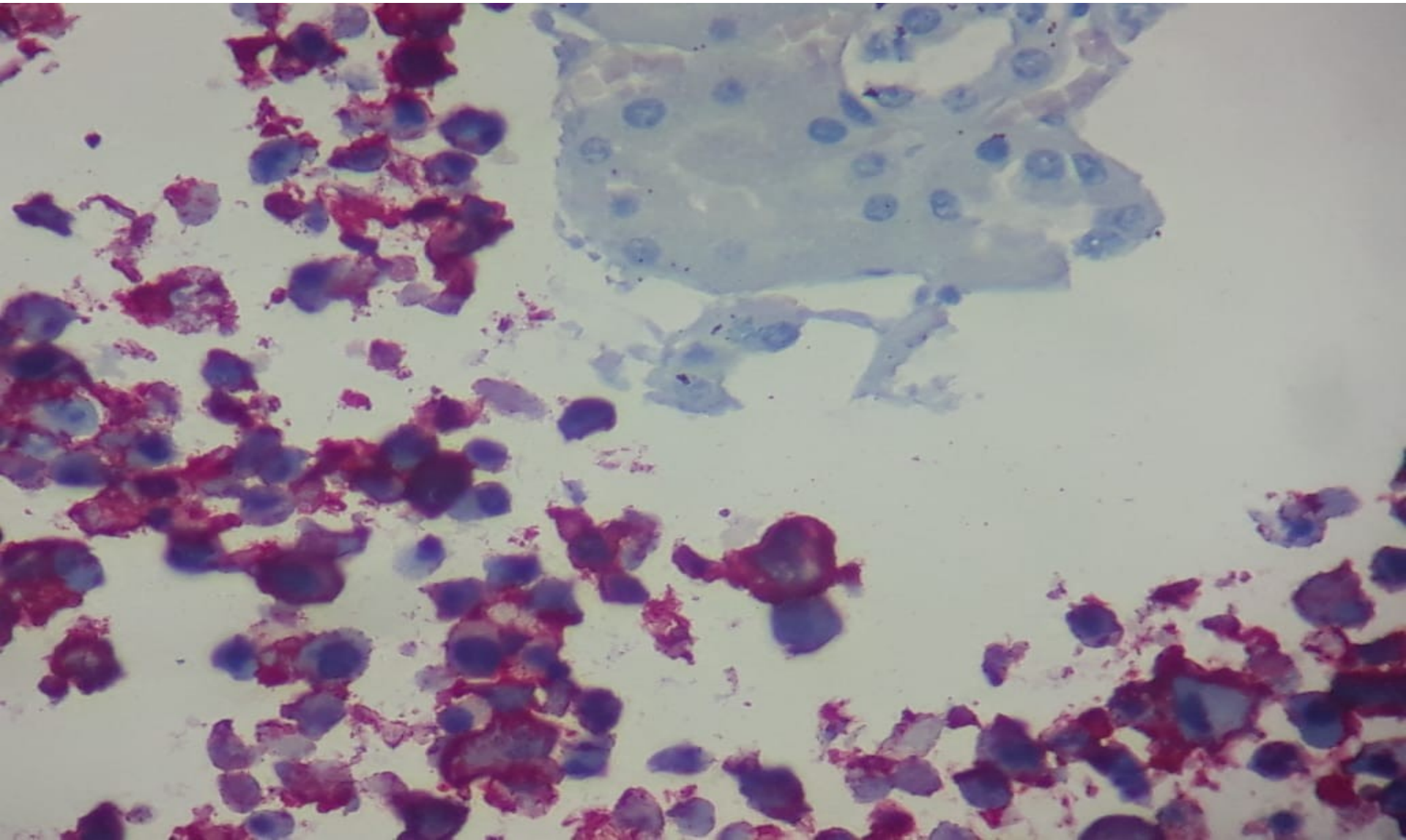
Resultado Chikungunya



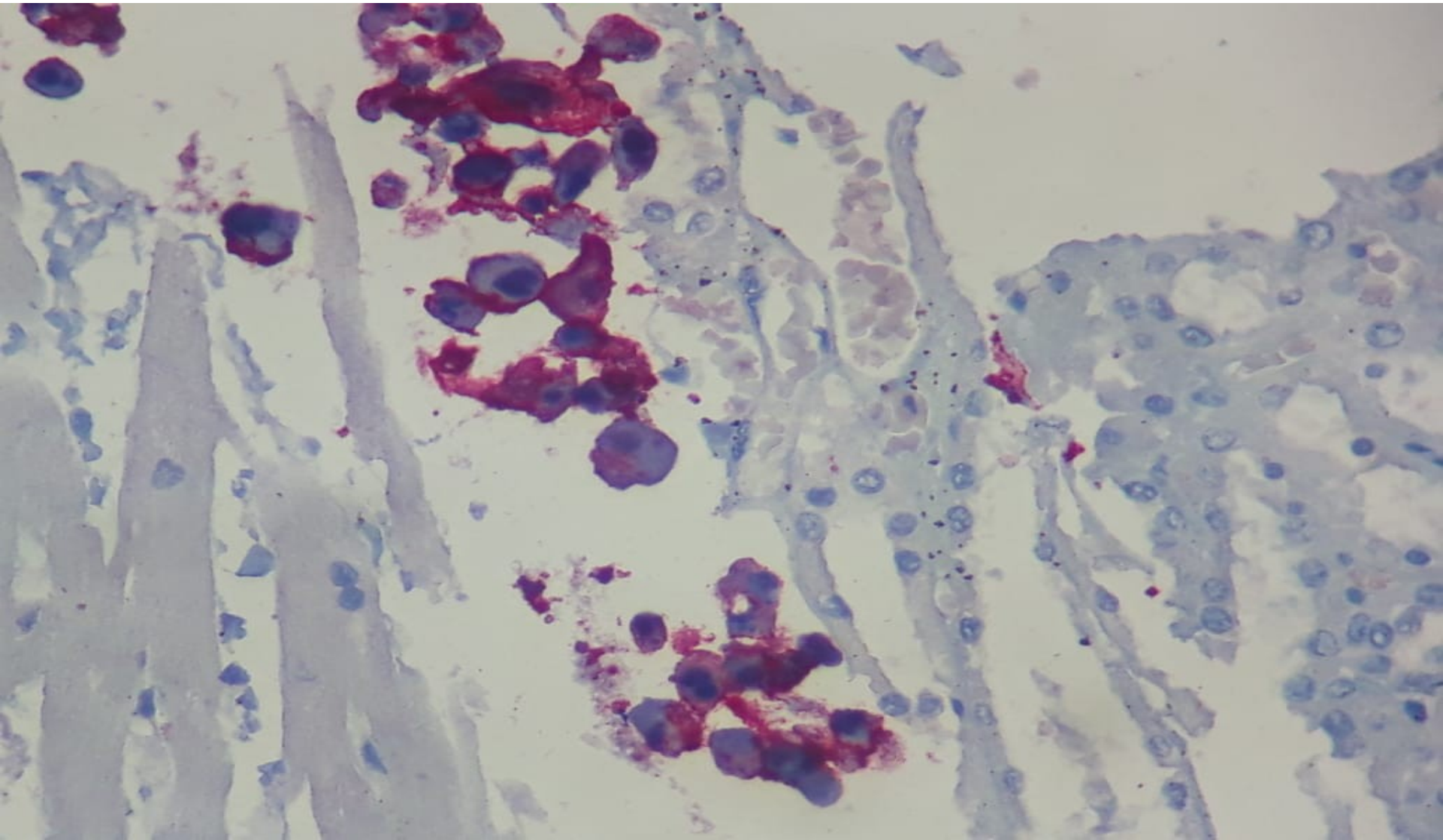
Resultado Chikungunya



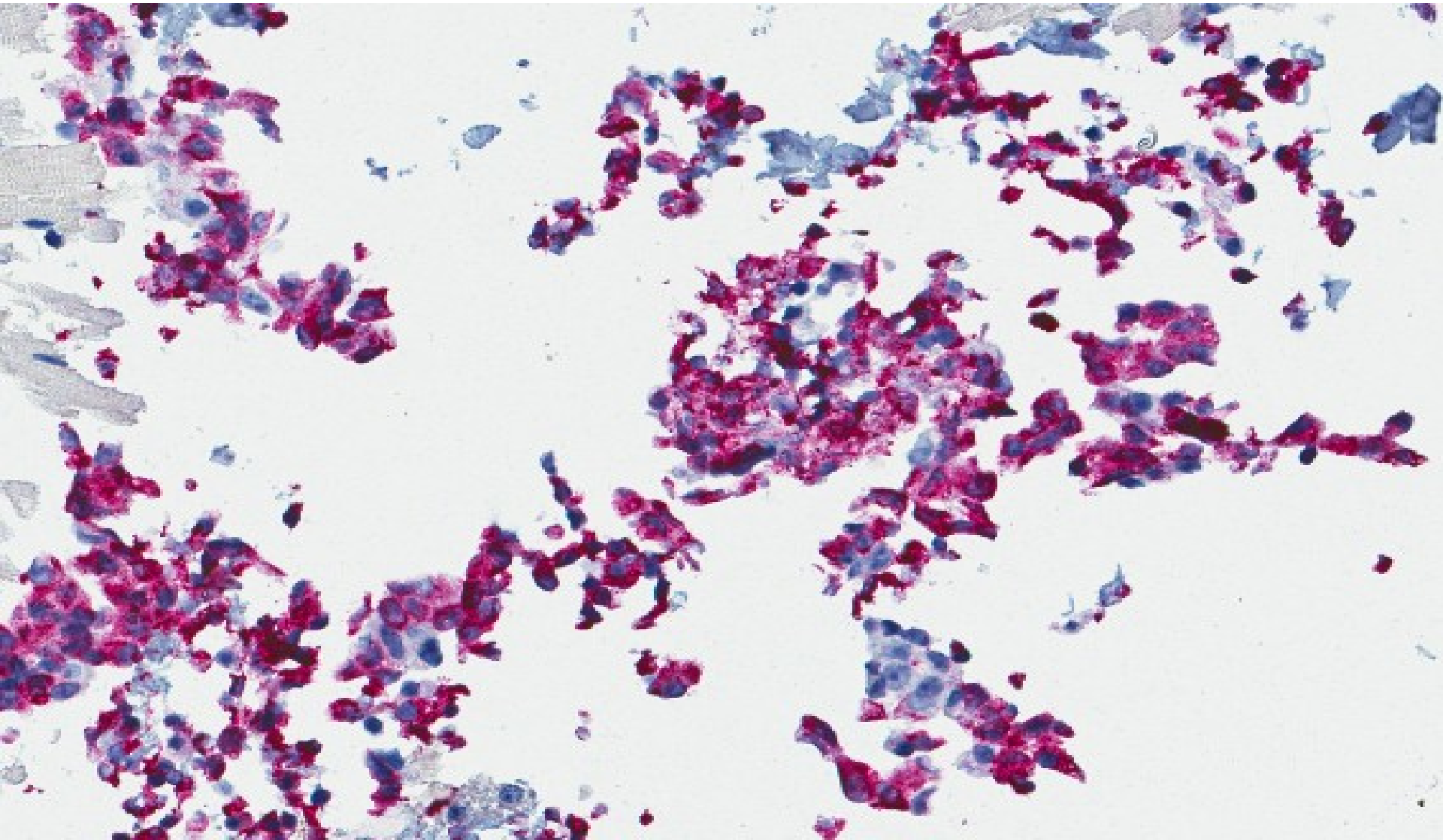
Resultado Chikungunya



Resultado Chikungunya



Resultado Dengue



Preparo de *pellets* de cultura usando HistoGel

MsC Luiz Claudio Ferreira

HISTOGEL
Thermo

Zika Virus – IDPB Diagnostic Activities – Outbreak Investigation

Jun 2015

Sept 2015

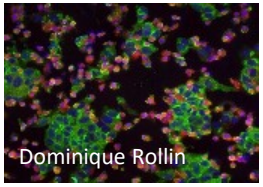
- Zika virus
- Antibody against Zika virus

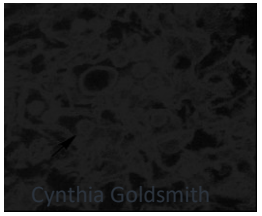
Mouse antibody to Zika virus
Provided by the Division of Vector-Borne Diseases, Fort Collins, CO

Dec 2015

4 cases from Brazil

Zika virus culture - Vero E6 Kidney cells

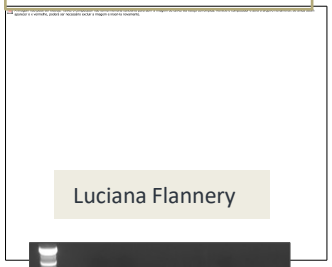




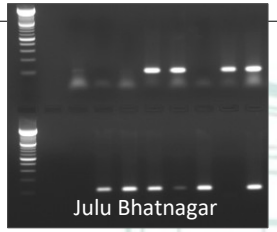
Jan, 10 – CDC Atlanta to Brazil MOH
First link – Zika virus, microcephaly and pregnancy loss

Jan 2016

- Immunohistochemical assay
- RT-PCR -FFPE

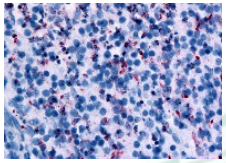


Luciana Flannery



Sept 2016

Anti-Zika NS1 3C2 Monoclonal antibody

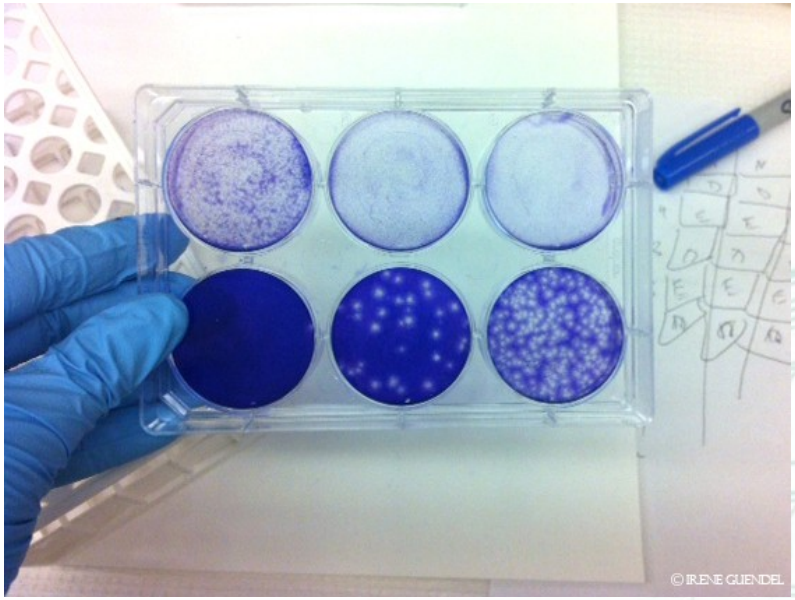


Zika virus non-structural protein 1 (3C2)
Jason M. Goldstein, Ph.D. - Immuno-Diagnostic Development (IDD) Team, Division of Scientific Resources

2017

Objetivo

- Preparar *pellets* de cultura viral, bacteriana ou fúngica usando HistoGel como material de ligação com o intuito de facilitar o processamento da amostra.



Procedimento

- Adicionar a cultura fixada em formol em tubos de 50mL identificados;

- Centrifugar o tubo a pelo menos 3.000rpm por 10 minutos;

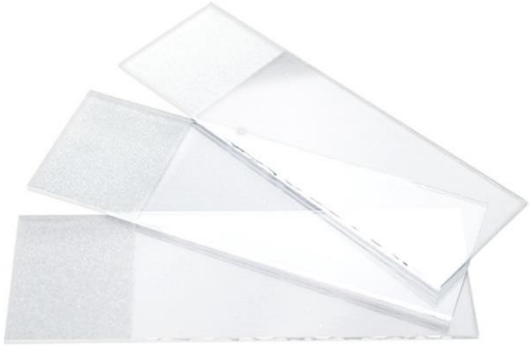
Procedimento

- Remover a formalina do tubo utilizando um pipeta e descarta-la corretamente;

- Adicionar álcool etílico 70% suficiente para cobrir o *pellet* de cultura e misturar batendo suavemente com os dedos;

Procedimento

- Centrifugar o tubo a pelo menos 3.000rpm por 10 minutos;



- Identificar uma lâmina de vidro limpa com 2” e 3”;

Procedimento

- Colocar tecido normal bem picado na lâmina com o mesmo volume do *pellet* de cultura a ser processado;

- Adicionar gotas de álcool 70% do tecido picado, conforme necessário para mantê-lo úmido;

Procedimento

- Remover o tubo da centrífuga e retirar quase todo o álcool com uma pipeta, descartando-o no recipiente adequado;

- Remover o *pellet* de cultura do tubo com uma pipeta descartável ou com uma espátula de aço (dependendo da viscosidade da amostra) e coloque em cima do tecido normal picado na lâmina;

Procedimento

- Picar ainda mais o tecido normal misturado com a cultura até que as partes do tecido sejam de 1mm^3;

- Para um tubo de 50mL, adicione HistoGel liquefeito suficiente para suspender o volume de tecido/cultura. Se o volume da mistura for maior que 4mm^3 então terá que ser aliquotado entre vários tubos com HistoGel.

Procedimento

- Adicionar a mistura tecido/cultura cuidadosamente ao centro do HistoGel aliquotado usando uma espátula de aço limpa com as extremidades estreitas;
- Centrifugar o tubo a pelo menos 3.000rpm por 10 minutos;
- Imprimir cassetes histológicos com número de identificação da amostra e preencha o registro;

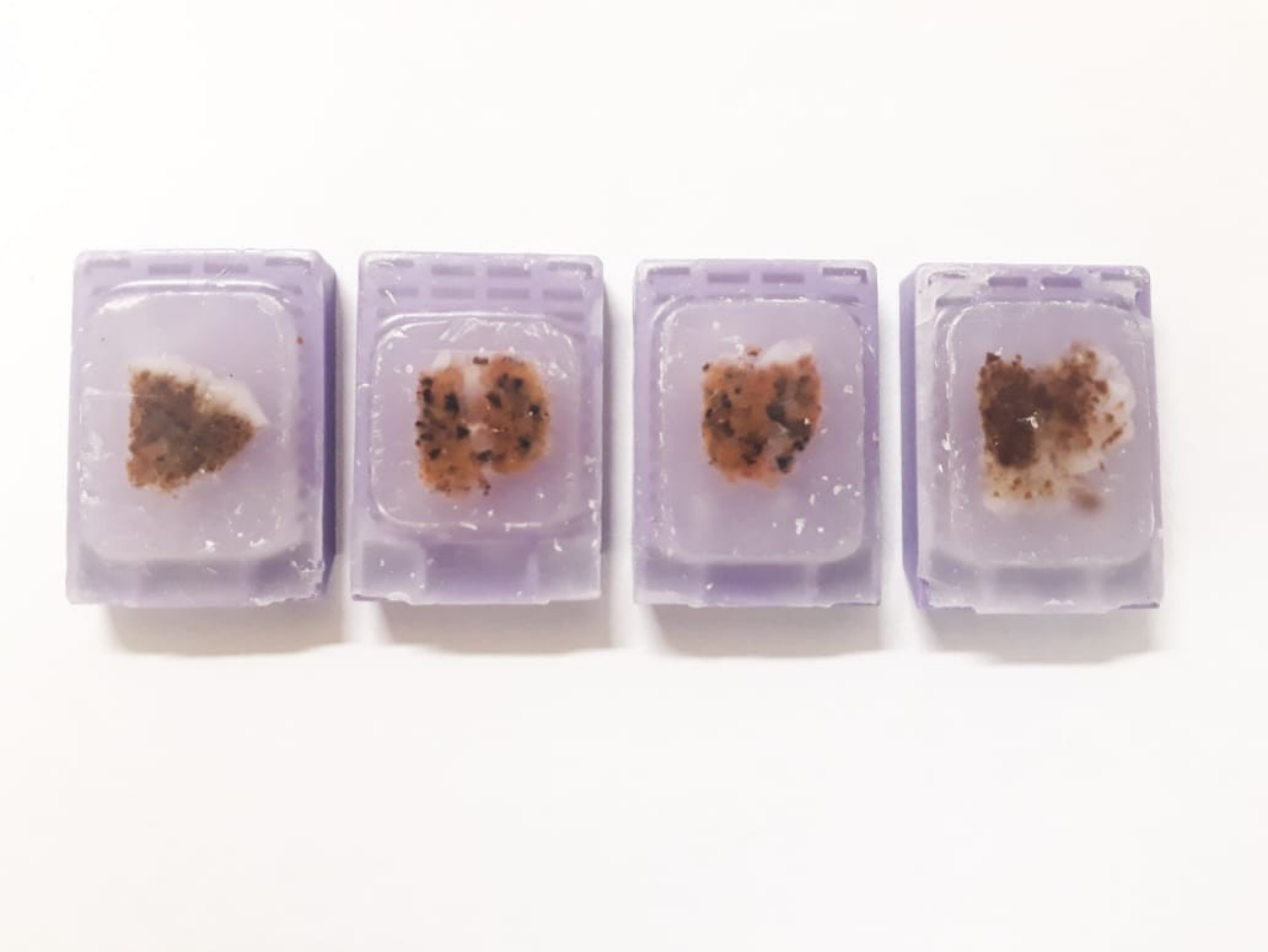
Procedimento

- Colocar o tubo da mistura de HistoGel centrifugado em um recipiente com gelo por no mínimo 15 minutos;
- Cortar um único pedaço de papel para lentes em 6 pedaços;
- Retire o gel do tubo usando uma espátula de aço limpa com as extremidades estreitas e envolva-o em um papel de lente quadrada e coloque em um cassete apropriado;

Procedimento

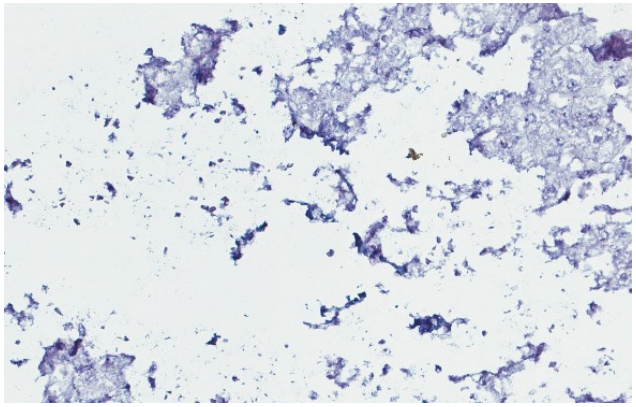
- Colocar o cassete num frasco de com álcool 70% e encaminhe ao processamento histológico;
- Retornar o HistoGel de estoque para a geladeira ou armazenar em temperatura ambiente coberto em papel alumínio;

BLOCOS DE CULTIVO CELULAR

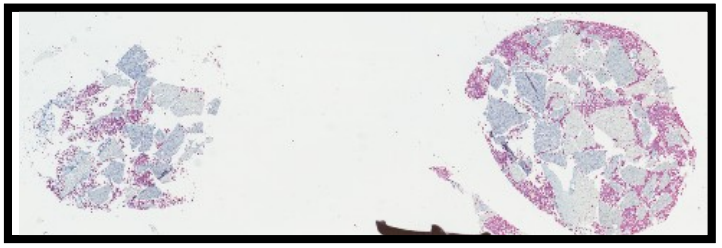


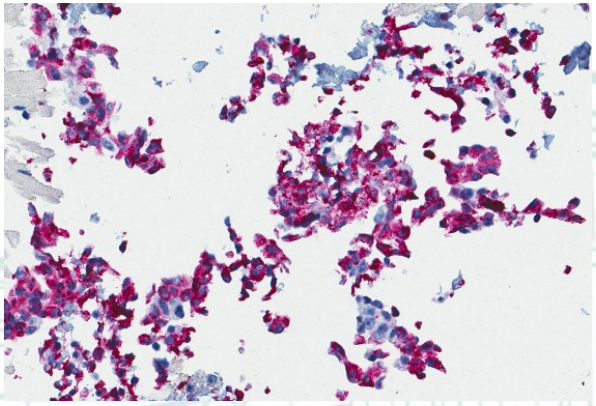
Dengue monoclonal antibody validation

Dengue 1 and 2 infected cells

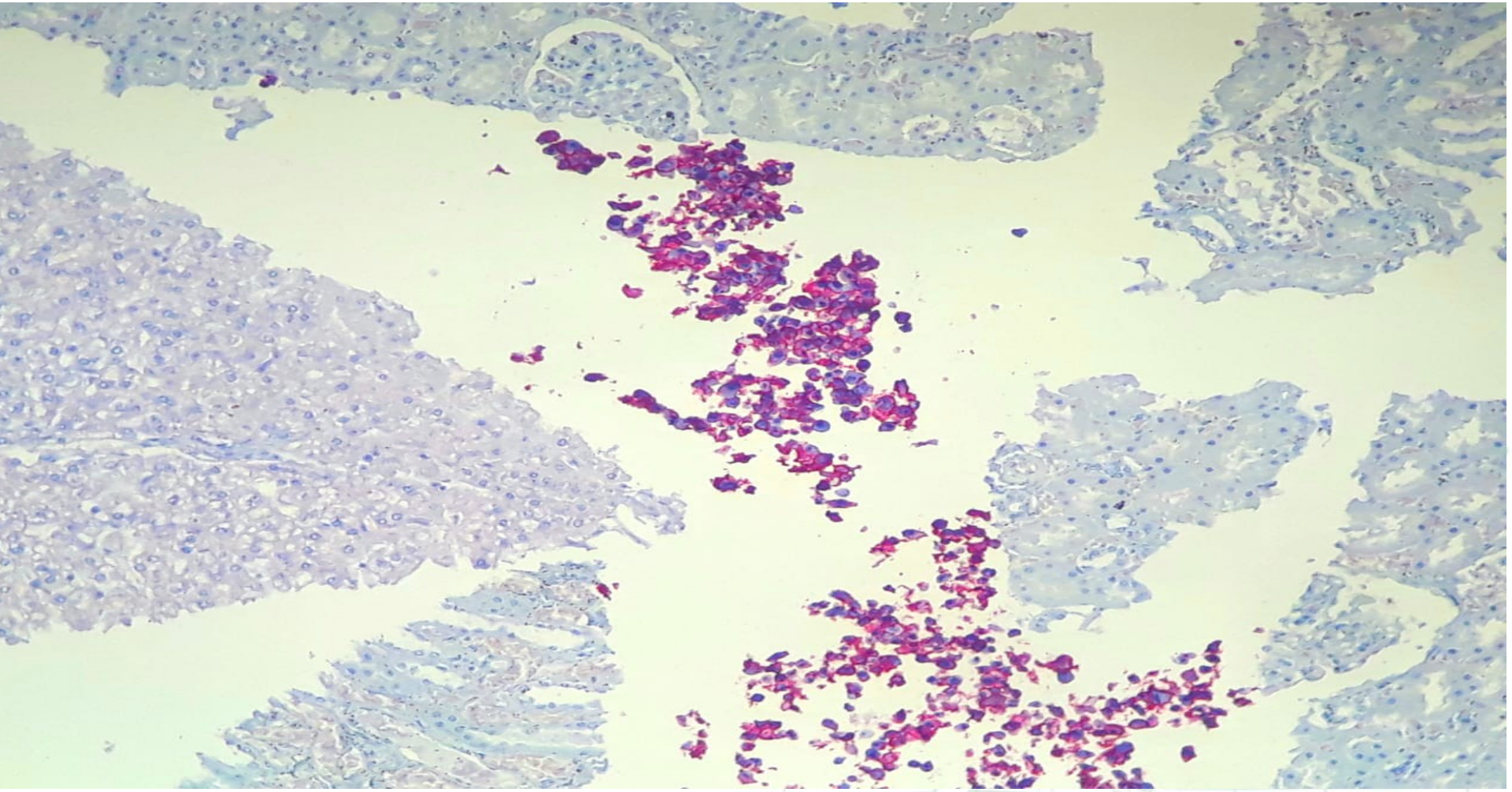
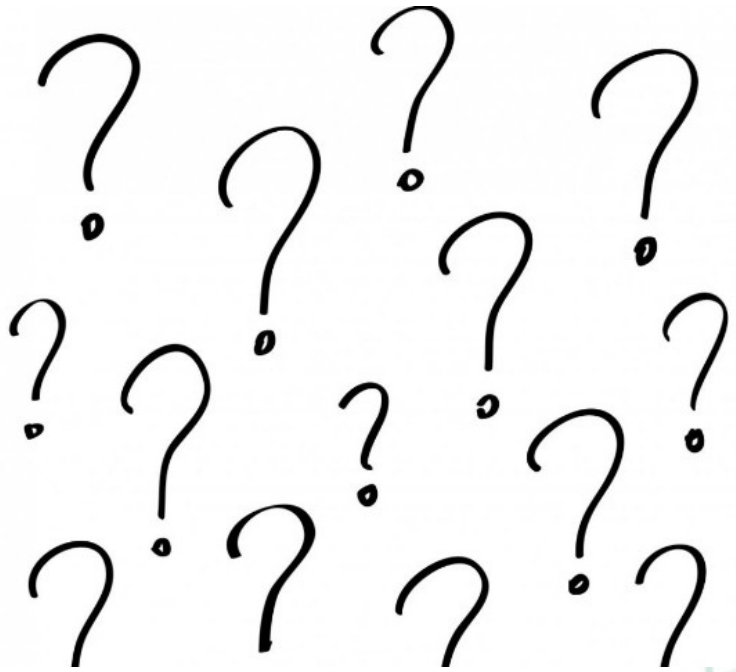


Dengue 3 and 4 infected cells





Teste de reação cruzada Dengue x Chikungunya



Obrigado!