

REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA: ALGUMAS MODIFICAÇÕES DE SUA TÉCNICA

Cláudio Santos FERREIRA *
Maria Esther de CARVALHO **

RSPU-B/183

FERREIRA, C. S. & CARVALHO, M. S. de — *Reações de imunofluorescência indireta: algumas modificações de sua técnica.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 7: 303-6, 1973.

RESUMO: *Propõem-se modificações de procedimentos rotineiros de reações de imunofluorescência indireta. A eluição das amostras de sangue dessecado contidas em papel-filtro é feita em placas ("godets") com tampas. Alças de níquel-cromo substituem pipetas capilares para a transferência de amostras de eluatos para as lâminas de microscopia. Propõe-se uma técnica rápida e eficiente de lavagem das preparações.*

UNITERMOS: *Imunofluorescência indireta (técnica)*.*

I N T R O D U Ç Ã O

Tendo um de nós a seu cargo a execução de reações de imunofluorescência indireta (RIFI) nos laboratórios da Superintendência de Saneamento Ambiental (SUSAM), seguimos inicialmente a orientação dos laboratórios de pesquisa dedicados ao assunto, em nosso meio. A técnica original foi descrita por CAMARCO (1966) e as modificações propostas não alteram sua essência.

As características do nosso serviço levaram-nos, entretanto, a submeter cada operação a um estudo crítico, com os objetivos:

a) simplificar as manipulações;

b) reduzir os custos;

c) aumentar a reprodutibilidade.

As simplificações propostas incidem sobre as técnicas de eluição, transporte dos eluatos para as lâminas, demarcação dos espaços onde se dão as reações, câmaras úmidas, lavagem das preparações e exame ao microscópio.

MATERIAL E MÉTODOS

a) "Godets" de porcelana do tipo usado em pintura, medindo 17,5 cm de comprimento e 11,5 cm de largura, dotados de tampa. Usaram-se os de 21

* Do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo — Av. Dr. Arnaldo, 455 — São Paulo, S.P. — Brasil.

** Da Divisão de Combate a Vetores da Superintendência de Saneamento Ambiental (SUSAM) — Rua Tamandaré, 649 — São Paulo, S.P. — Brasil.

lugares (concauidades), cada um dos quais com capacidade situada ao redor de 0,9 ml. Para a eluição, distribuem-se 20 discos de papel-filtro (contendo as amostras de sangue) em número correspondente de concauidades dos "godets" (Fig. 1). Os volumes de solução salina adequados às diluições desejadas são transferidos por meio de pipeta graduada.

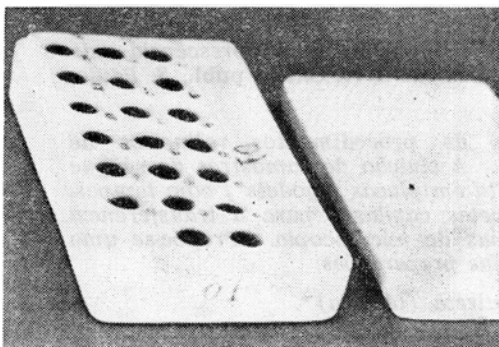


Fig. 1 — RIFI: algumas modificações de sua técnica.

b) Alças de fio de níquel-cromo de 0,4 mm de diâmetro nominal (n.º 26 AWG), feitas para conter cerca de 4 microlitros, usam-se para transferir os eluatos para os lugares respectivos das lâminas (Fig. 2). Substituem-se desse modo as pipetas capilares.

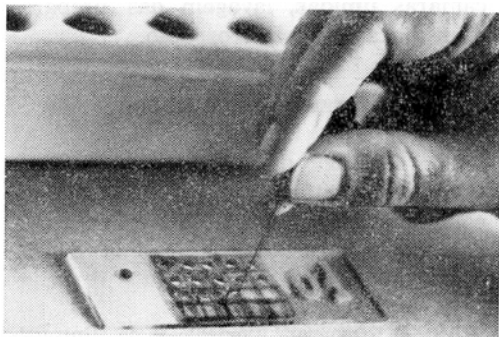


Fig. 2 — RIFI: algumas modificações de sua técnica.

c) Esmalte de unhas incolor, ao qual é acrescentado carvão em pó até que adquira uma cor cinza-escura, passou a ser usado para delimitar as áreas onde se colocam os reagentes. Usam-se, geralmente, na técnica de imunofluorescência, lâminulas de 25 X 40 mm sob as quais examinam-se 10 a 15 reações. Passamos a empregar lâminulas de 24 X 32 mm sobre um retículo que limita 20 lugares.

d) Caixas de plástico de 12 cm de comprimento, 9 cm de largura e 4,5 cm de altura, com tampa. Dois bastões de vidro presos em posição horizontal, paralelos e colocados no mesmo plano a cerca de 2 cm de distância do fundo da caixa, servem de suporte para as lâminas. Esses recipientes podem conter 3 lâminas e são usados como câmaras úmidas e para a lavagem das preparações. O processo de lavagem por meio de imersão, por duas vezes, em solução salina contida em frascos de Coplin é pouco eficiente e dispendioso. Mais compatível com os conhecimentos atuais sobre o assunto é a técnica que consiste em recobrir as lâminas, sem retirá-las das câmaras úmidas, com solução salina, rejeitada após um minuto. A operação é repetida por mais duas vezes, permanecendo nessas ocasiões o líquido por dois minutos.

e) Objetiva a seco, de fluorita (40 X, AN=0,75) em conjunto com ocular de campo amplo (10 X). Uma cuidadosa centragem do sistema de iluminação é suficiente para compensar, nos aparelhos modernos, a menor luminosidade dessas objetivas.

COMENTÁRIOS

Freqüentemente executam-se reações de diversos tipos em placas escavadas. Custando apenas uma pequena fração do preço destas, "godets" de vários mo-

delos e dimensões podem ser facilmente adquiridos em lojas de artigos para desenho e pintura. Demos preferência a um tipo de 21 lugares (o que mais se aproxima das nossas necessidades), com tampa.

Pequenas quantidades de líquidos podem ser simples e rapidamente transferidas por meio de alças de platina. Fios de níquel-cromo, usados como matéria prima para o fabrico de resistores, substituem os de platina. Diversos diâmetros podem ser usados. Em nossa experiência, entretanto, o fio n.º 26 (AWG) mostrou-se o mais adequado. Um grande número de alças de dimensões razoavelmente uniformes pode ser confeccionado para o transporte de eluatos, sendo a lavagem de todas as que foram empregadas durante uma ou mais sessões feita de uma só vez, usando-se solução de detergente comum e água. A substituição das pipetas capilares por alças metálicas resolve o difícil problema de lavagem, além do de elevada percentagem de quebra. A dificuldade de controle de lavagem das pipetas pode contribuir para o falseamento dos resultados das reações causado por material que nelas permaneça. A lavagem das preparações por meio de pequenas quantidades de solução salina renovadas três vezes é mais eficiente, rápida e econômica do que a anteriormente usada. É sabido que a eficiência da lavagem depende muito mais do número de vezes

em que o líquido é trocado do que do volume deste.

A leitura dos resultados das reações revela-se mais rápida quando diminuem, dentro de certos limites, as dimensões das superfícies retangulares correspondentes a cada caso. Torna-se imprescindível uma distribuição uniforme do antígeno. O carvão incorporado ao esmalte impede a difusão da luz excitadora sobre a preparação, o que ocorre quando é usado esmalte vermelho.

As objetivas de imersão projetadas para microscopia de fluorescência oferecem vantagens inegáveis, sendo recomendável seu emprego em certos trabalhos de pesquisa. Leituras em grande escala podem, sem nenhum inconveniente, ser levadas a efeito usando-se objetivas comuns acromáticas ou, de preferência, de fluorita, a seco. Desse modo o óleo de imersão é usado apenas entre o condensador e a lâmina, não sendo necessário fixar a lamínula. As oculares de campo amplo, permitindo ao microscopista usar a visão periférica, facilitam o encontro dos elementos fluorescentes e reduzem a fadiga ocular.

Em nosso serviço, as alterações mencionadas reduziram o custo de materiais em mais de 40% para o mesmo número de reações. Em termos de tempo, a redução foi da ordem de 30%, sem contar o aumento do ritmo de leitura.

FERREIRA, C. S. & CARVALHO, M. E. de — Reações de imunofluorescência indireta: algumas modificações de sua técnica *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7:303-6, 1973.

RSPU-B/183

FERREIRA, C. S. & CARVALHO, M. E. de — [Indirect immunofluorescence tests: some modifications of their technique.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 7: 303-6, 1973.

SUMMARY: Some simplifications intended for routine operations included immunofluorescence tests are proposed. The elution of dried blood samples is performed on test plates (water-color mixing plates, with a lid) instead of in test tubes. Nickel-chromium wire loops are substituted for capillary pipettes in transferring eluate samples to microscope slides. A rapid and efficient washing technique is proposed.

UNITERMS: Fluorescence antibody technic *.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Chagas' disease. Technical modification employ-

ing preserved cultural forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop.* S. Paulo, 8:229-34, 1966.

Recebido para publicação em 15-6-1973

Aprovado para publicação em 10-7-1973