



Teste rápido de imuno-histoquímica: uma nova ferramenta para o diagnóstico da raiva

Fernanda Guedes Luiz

Teste rápido de imuno-histoquímica

- Início em 2006 no *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC em Atlanta.

Evaluation of a Direct, Rapid Immunohistochemical Test for Rabies Diagnosis

product of the reaction can be observed by light microscopy, and RABV antigen appears as magenta inclusions against a blue neuronal background. The test recognizes all genotype 1 variants of RABV examined to date and all representative lyssaviruses. Modifications of a former indirect test have led to a direct test (dRIT) that uses a cocktail of highly concentrated and purified biotinylated anti-nucleocapsid monoclonal antibodies produced in vitro in a direct staining approach and allows a diagnosis to be made in <1 hour. For the routine diagnosis of rabies, glycerol saline is a convenient preservative in situations in which refrigeration or freezing facilities are not promptly available (7).

We report findings of a preliminary study to evaluate the dRIT, comparing results of the dRIT carried out under field conditions in Tanzania with the dRIT and DFA per-

Tiziana Lembo,^{*} Michael Niezgoda,[†] Andrés Velasco-Villa,[‡] Sarah Cleaveland,^{*} Eblate Ernest,[‡] and Charles E. Rupprecht[†]

OPEN ACCESS Freely available online



Rabies Diagnosis for Developing Countries

Salome Dürr¹, Service Naïssengar², Rolande Mindekem³, Colette Diguimbye², Michael Niezgoda⁴, Ivan Kuzmin⁴, Charles E. Rupprecht⁴, Jakob Zinsstag^{1*}

¹Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland, ²Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, NDjaména, Tchad, ³Centre de Support en Santé International, NDjaména, Tchad, ⁴Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America

OPEN ACCESS Freely available online



Comparison of Biotinylated Monoclonal and Polyclonal Antibodies in an Evaluation of a Direct Rapid Immunohistochemical Test for the Routine Diagnosis of Rabies in Southern Africa



Andre Coetzer¹, Claude T. Sabeta², Wanda Markotter¹, Charles E. Rupprecht³, Louis H. Nel^{1*}

¹Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria, Gauteng, South Africa, ²Agricultural Research Council-Onderstepoort Veterinary Institute, Rabies Division, Gauteng, South Africa, ³Ross University School of Veterinary Medicine, Betsitsero, St. Kitts, West Indies

Evaluation of a Direct Rapid Immunohistochemical Test (dRIT) for Rapid Diagnosis of Rabies in Animals and Humans

Shampur Narayan Madhusudana[✉], Sundaramurthy Subha, Ullas Thankappan and Yajaman Belludi Ashwin

Department of Neurovirology, National Institute of Mental Health and Neurosciences (NIMHANS), Bangalore 560029, India



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



Evaluation of an indirect rapid immunohistochemistry test for the differentiation of rabies virus variants

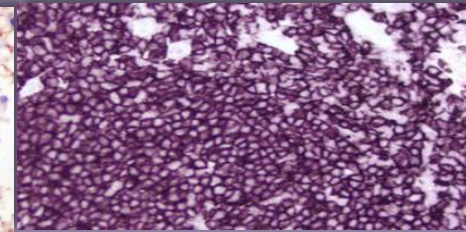
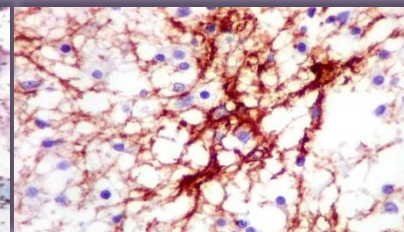
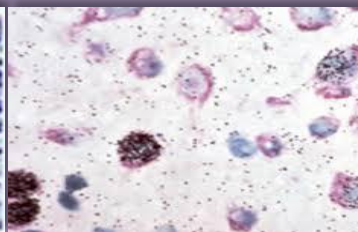
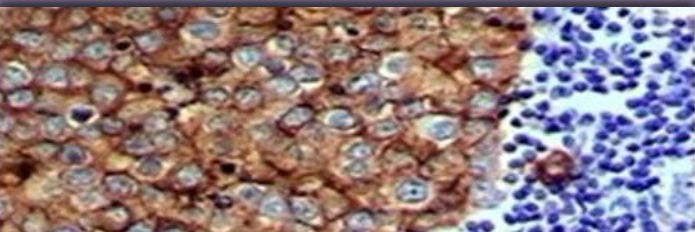
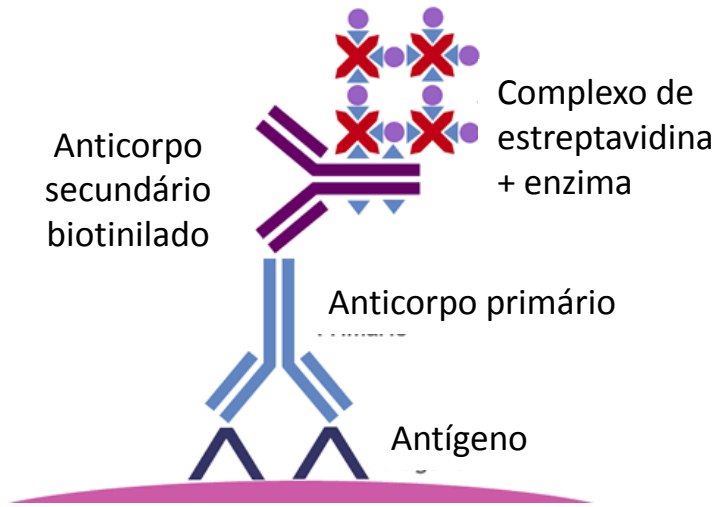
Jessie L. Dyer^{*}, Michael Niezgoda, Lillian A. Orciari, Pamela A. Yager, James A. Ellison, Charles E. Rupprecht

Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, Parasites and Rabies Branch, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd. NE, MS C13, Atlanta, GA, USA



Imuno-histoquímica

Princípio básico: reconhecimento do antígeno (presente no tecido) por um anticorpo específico, associado a diversos tipos de processos de visualização/revelação.



Projeto de Pesquisa

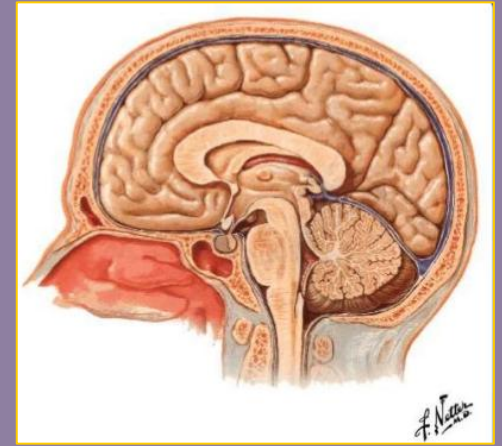
“Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade do teste rápido de IHQ com a técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da raiva”.



Laboratórios de Imuno-histoquímica e Virologia
Elaine Raniero; Keila Iamamoto; Samira Achkar

Desenho do Estudo

- Período de Janeiro a setembro de 2015



Critérios de inclusão

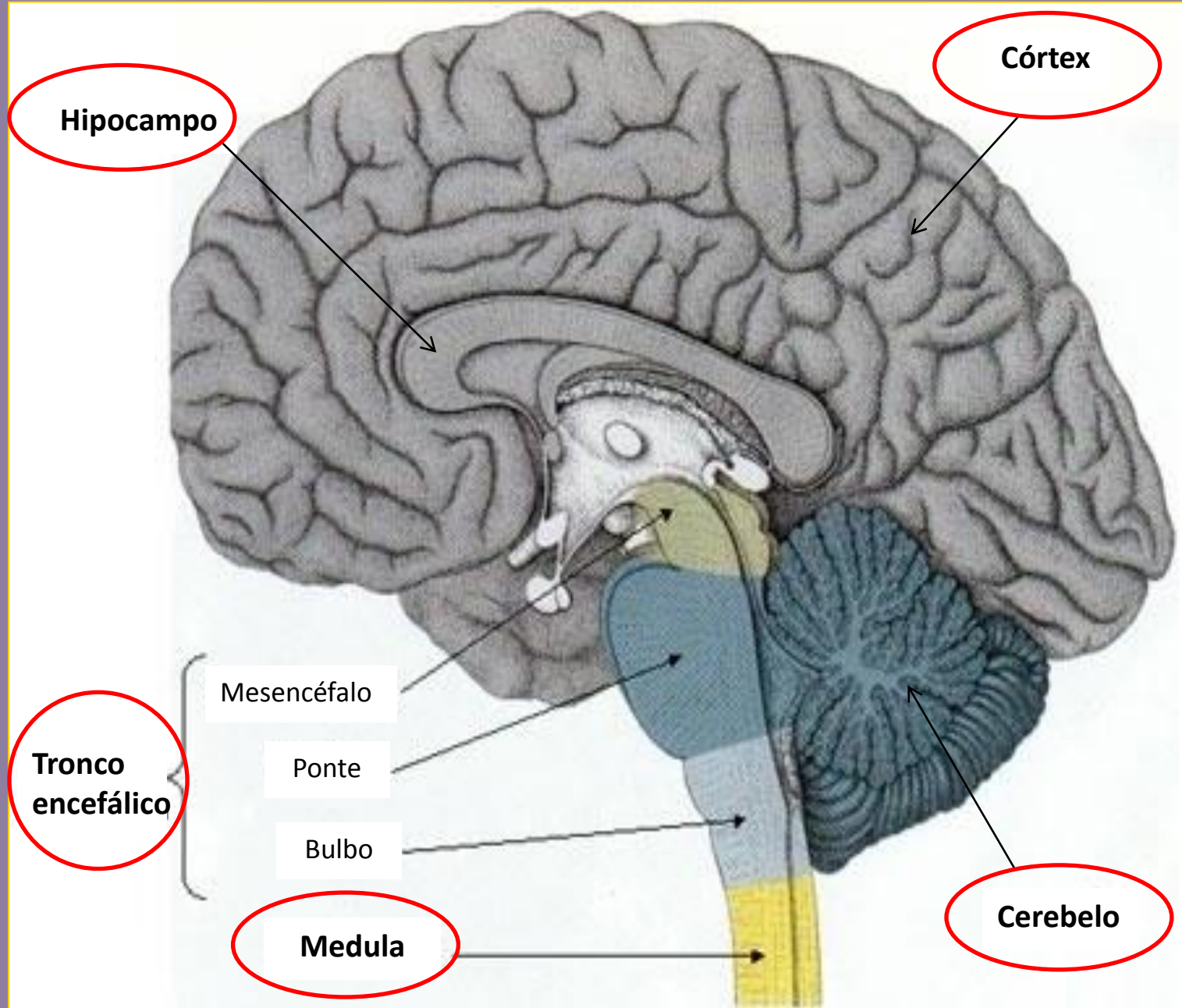
- representatividade da amostra de Sistema Nervoso Central para o estudo.
- amostras refrigeradas e/ou congeladas.

Critério de exclusão

- amostra de Sistema Nervoso Central não representativa para o estudo.

➤ *As amostras utilizadas no estudo foram provenientes da **Seção de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur**, São Paulo, as quais foram colhidas para fins diagnósticos e, posteriormente processadas de forma a compor o material para esse estudo.*

➤ *Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Pasteur de São Paulo – CEUA, São Paulo, sob o protocolo **nº 04/2014**.*






Desenho do Estudo

Identificação da AMOSTRA		
		
		

LÂMINA PARA
IMUNOFLOURESCÊNCIA
DIRETA



Identificação da AMOSTRA




decalques

LÂMINA PARA
IMUNO-
HISTOQUÍMICA

Anticorpo primário (policlonal): cedido pelo Prof. Dr. Pedro Fernando Vasconcelos, pesquisador do Instituto Evandro Chagas, Belém/PA.

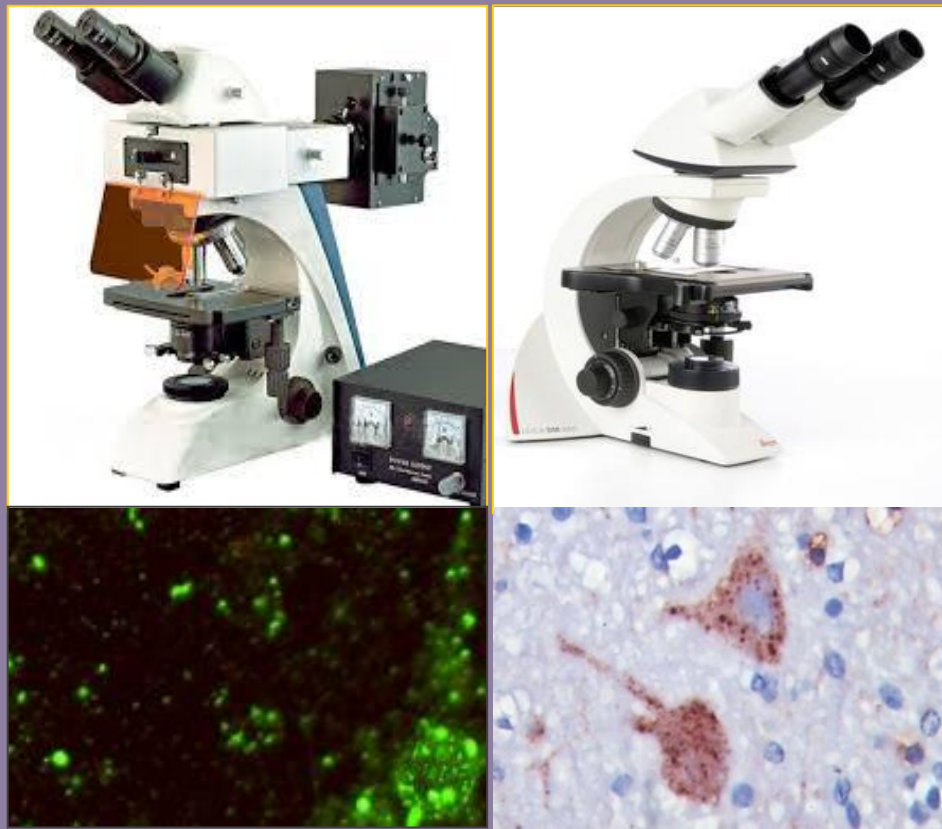


TESTE RÁPIDO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

1. Realização dos *imprints* dos fragmentos de SNC em lâminas de vidro silanizadas e retirado o excesso levemente com papel de filtro;
2. Secagem das lâminas por dois minutos à temperatura ambiente;
3. Imersão das lâminas em solução fixadora de formol a 10% tamponado à temperatura ambiente durante 10 minutos;
4. Lavagem das lâminas em *PBS* pH 7,4 por dois minutos;
5. Bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes a 3% por duas vezes de 10 minutos ao abrigo da luz;
6. Lavagem das lâminas em *PBS* pH 7,4 por dois minutos;
7. Bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 10% durante 15 minutos à temperatura ambiente;
8. Incubação das lâminas com anticorpo primário policlonal anti-proteínas totais do vírus da raiva em uma titulação de 1:150 por 15 minutos à temperatura ambiente;
9. Incubação das lâminas com o sistema de detecção *EnVision-HRP* (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K4007) pronto para uso por 15 minutos à temperatura ambiente;
10. Lavagem das lâminas em *PBS* pH 7,4 por dois minutos;
11. Revelação das lâminas com o cromógeno diaminobenzidina por cerca de 30 a 60 segundos;
12. Lavagem das lâminas em água destilada por três vezes de dois minutos e contracoloração com hematoxilina de Harris por dois minutos.
13. Secagem das lâminas à temperatura ambiente e montagem com glicerina/*PBS* pH 7,4 a 50%.
14. Manter as lâminas refrigeradas.

Tempo de reação: 1 hora e 30 minutos

Desenho do Estudo



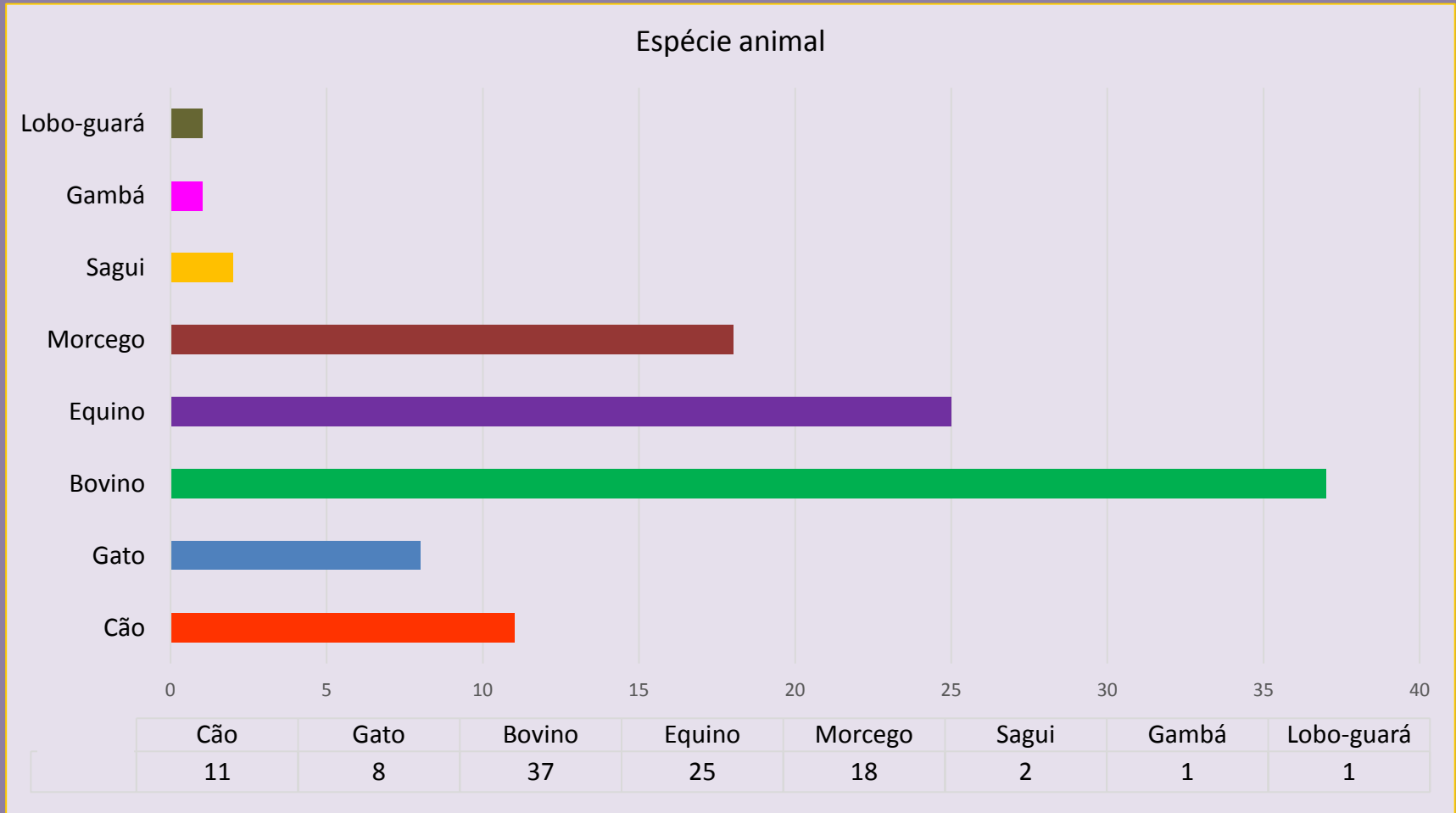
Análise estatística

O teste (*kappa*) será empregado para avaliar a concordância entre as técnicas de diagnóstico realizadas.

Avaliação semi-quantitativa

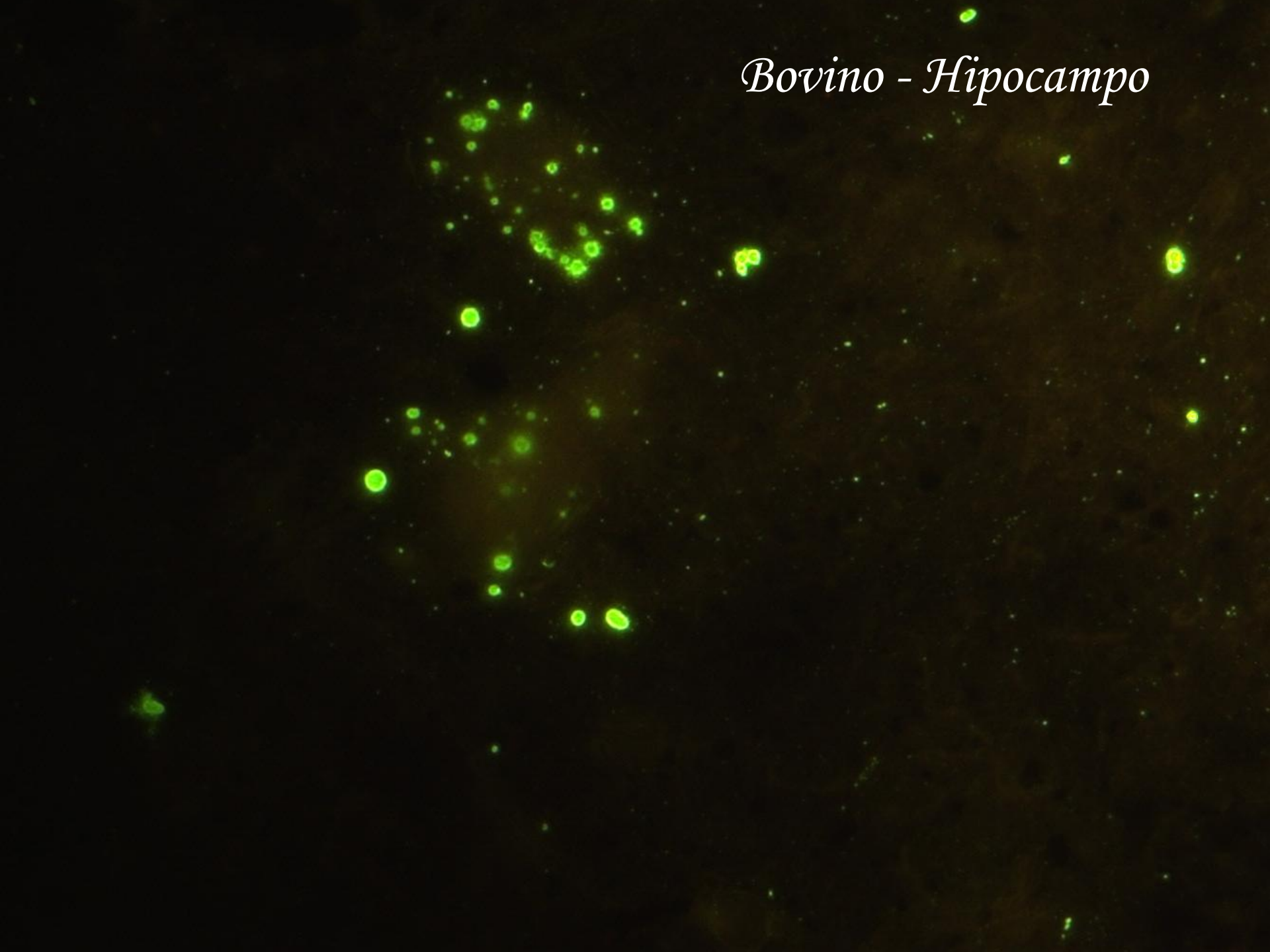
- : negativo
- +: rara presença de partículas antigênicas e/ou inclusões virais
- ++: presença de campos negativos e escasso número de partículas antigênicas e/ou inclusões virais
- +++ : distribuição homogênea de partículas antigênicas e/ou inclusões virais, mesmo com campos negativos
- ++++: distribuição homogênea de partículas antigênicas e/ou inclusões virais, porém sem campos negativos

Desenho do Estudo

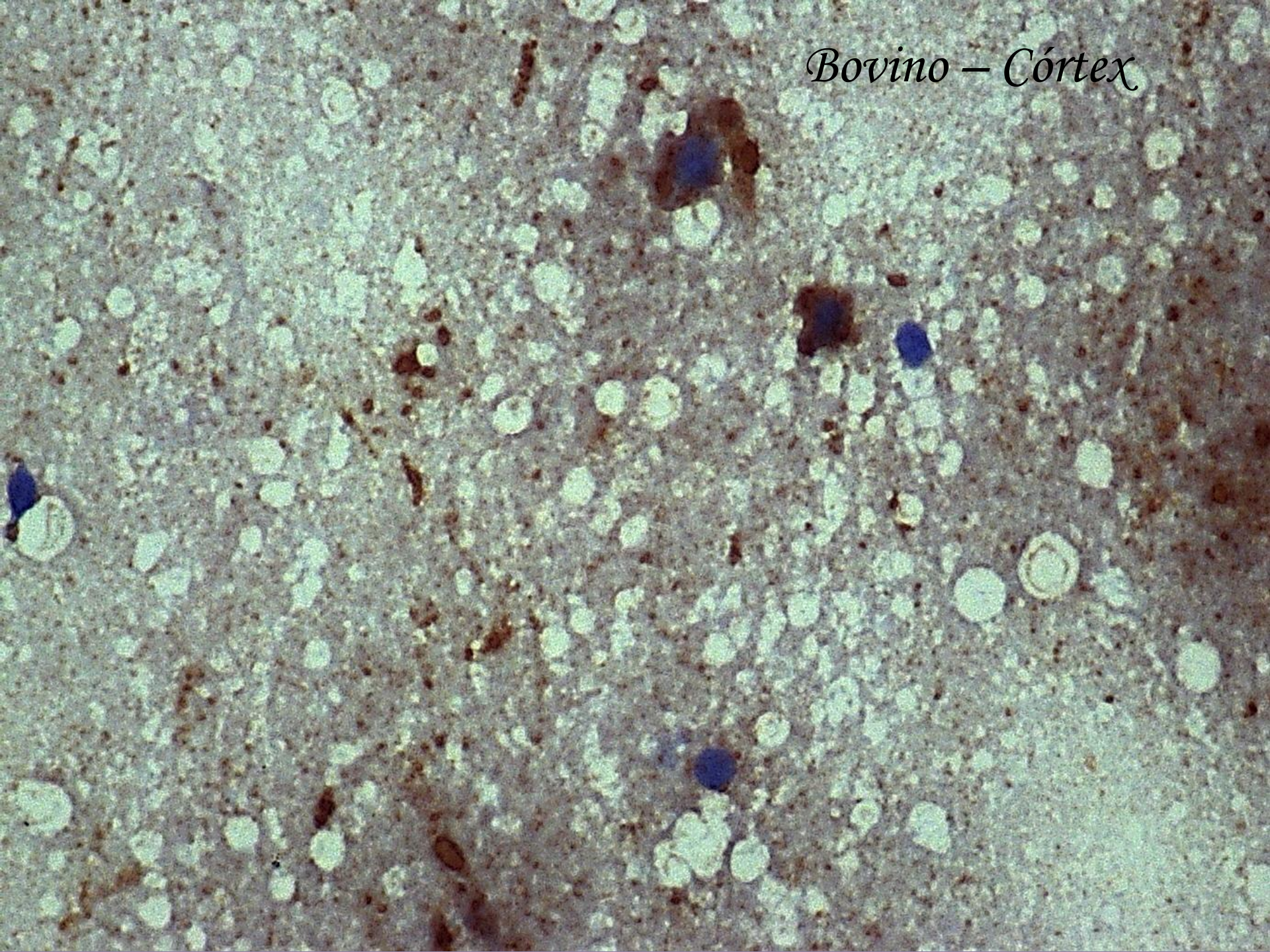


Total de 103 amostras de SNC ---- 292 fragmentos avaliados

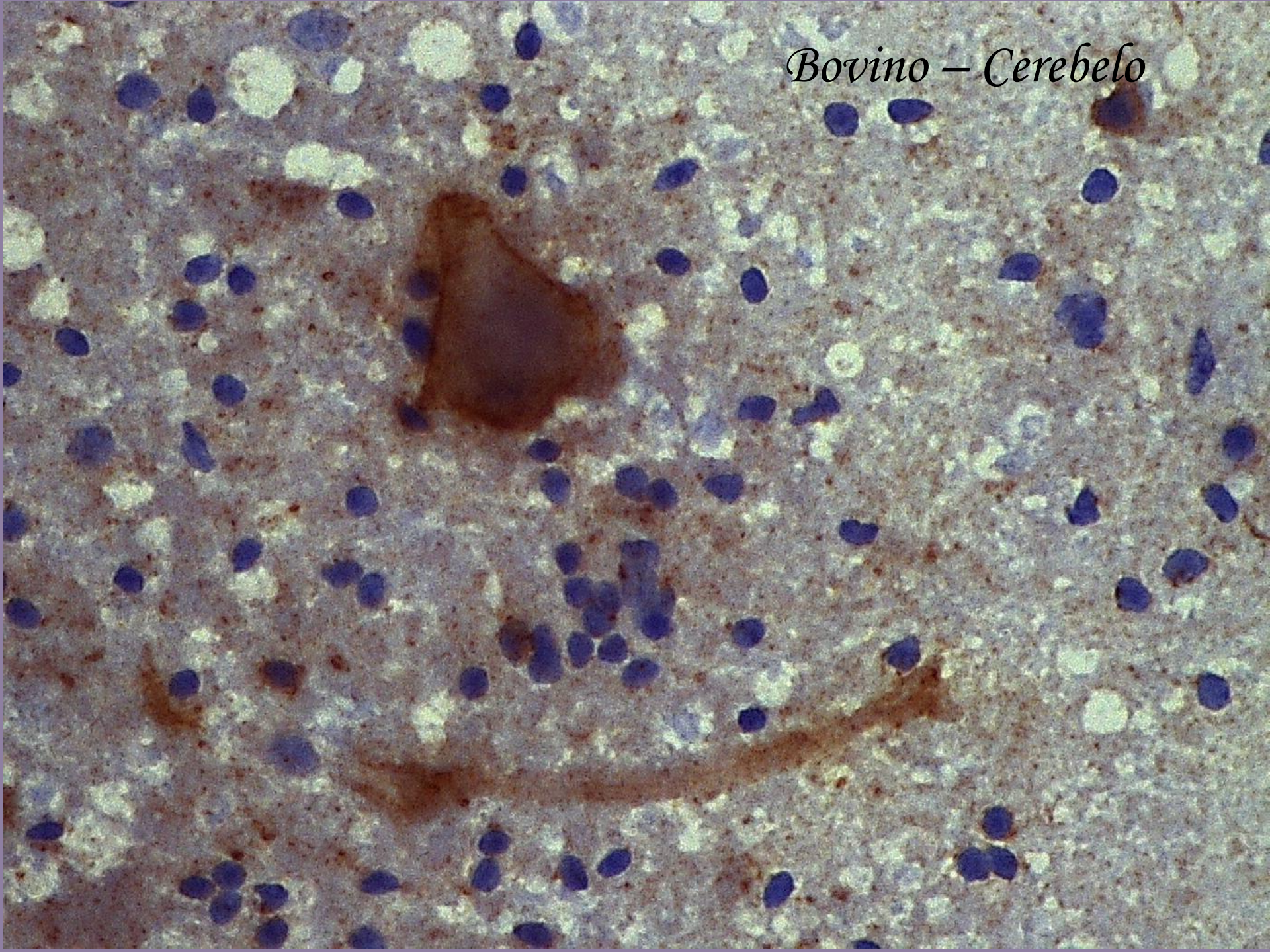
Bovino - Hipocampo



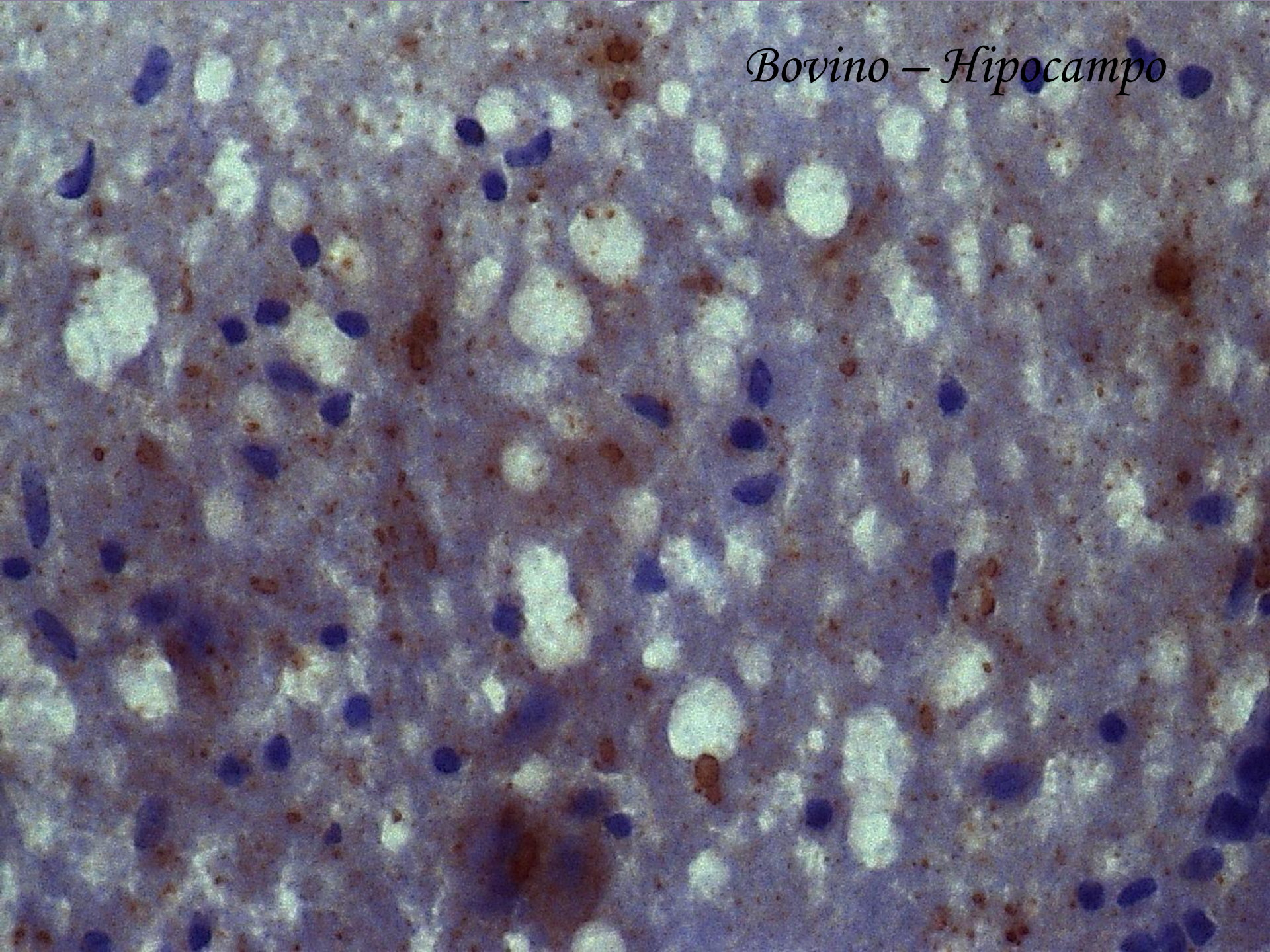
Bovino – CórteX



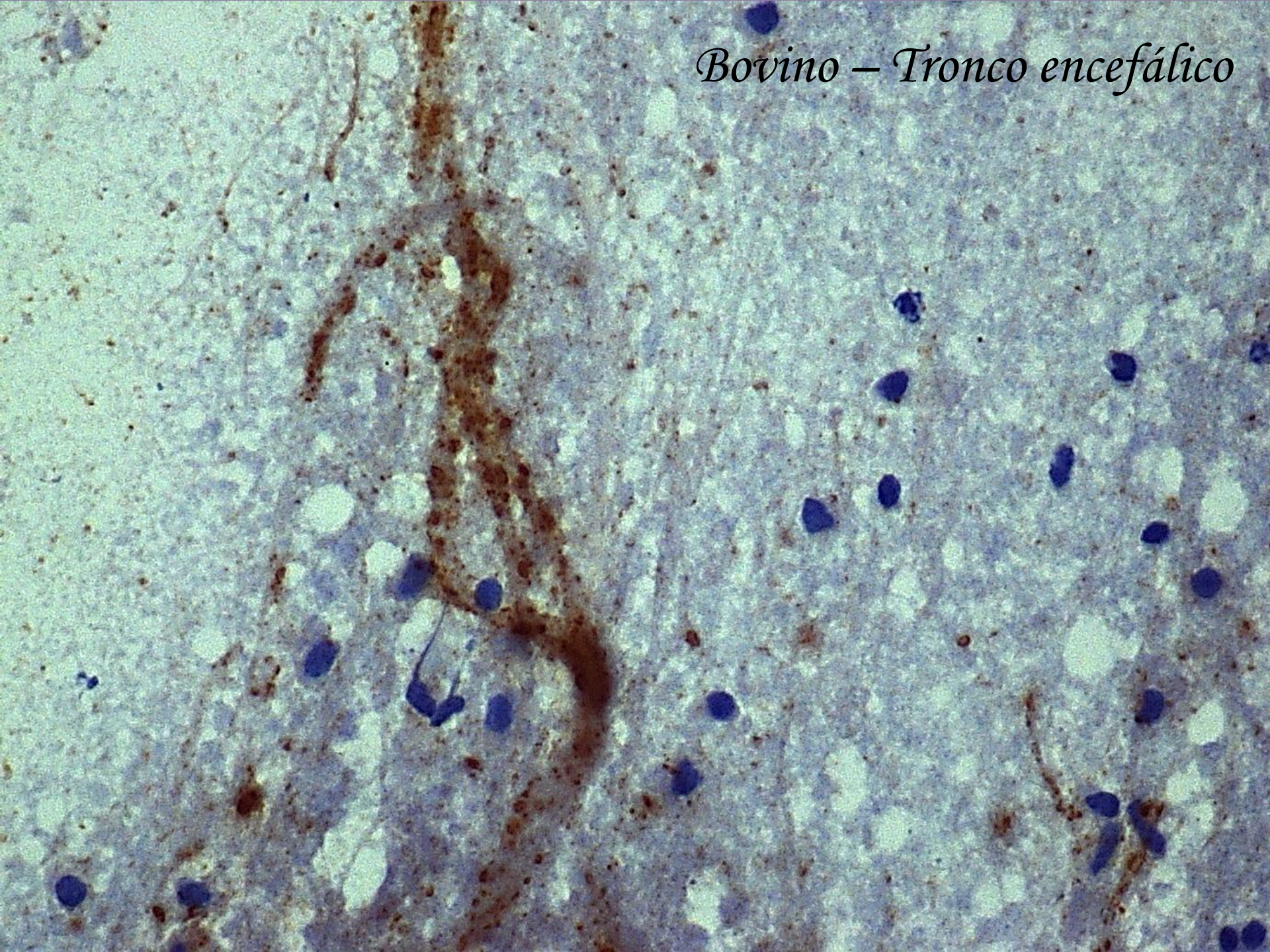
Bovino – Cerebello



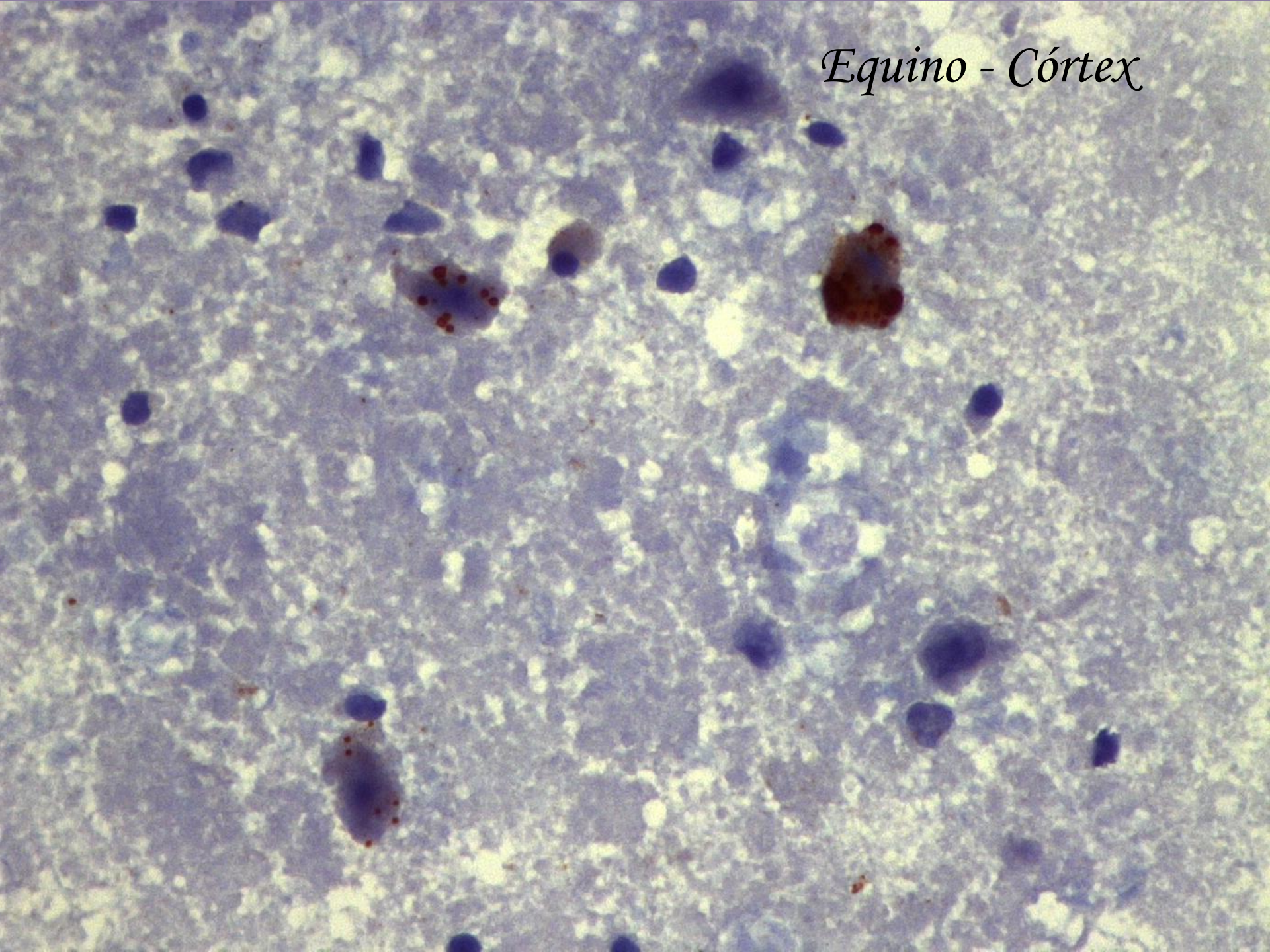
Bovino – Hipocampo



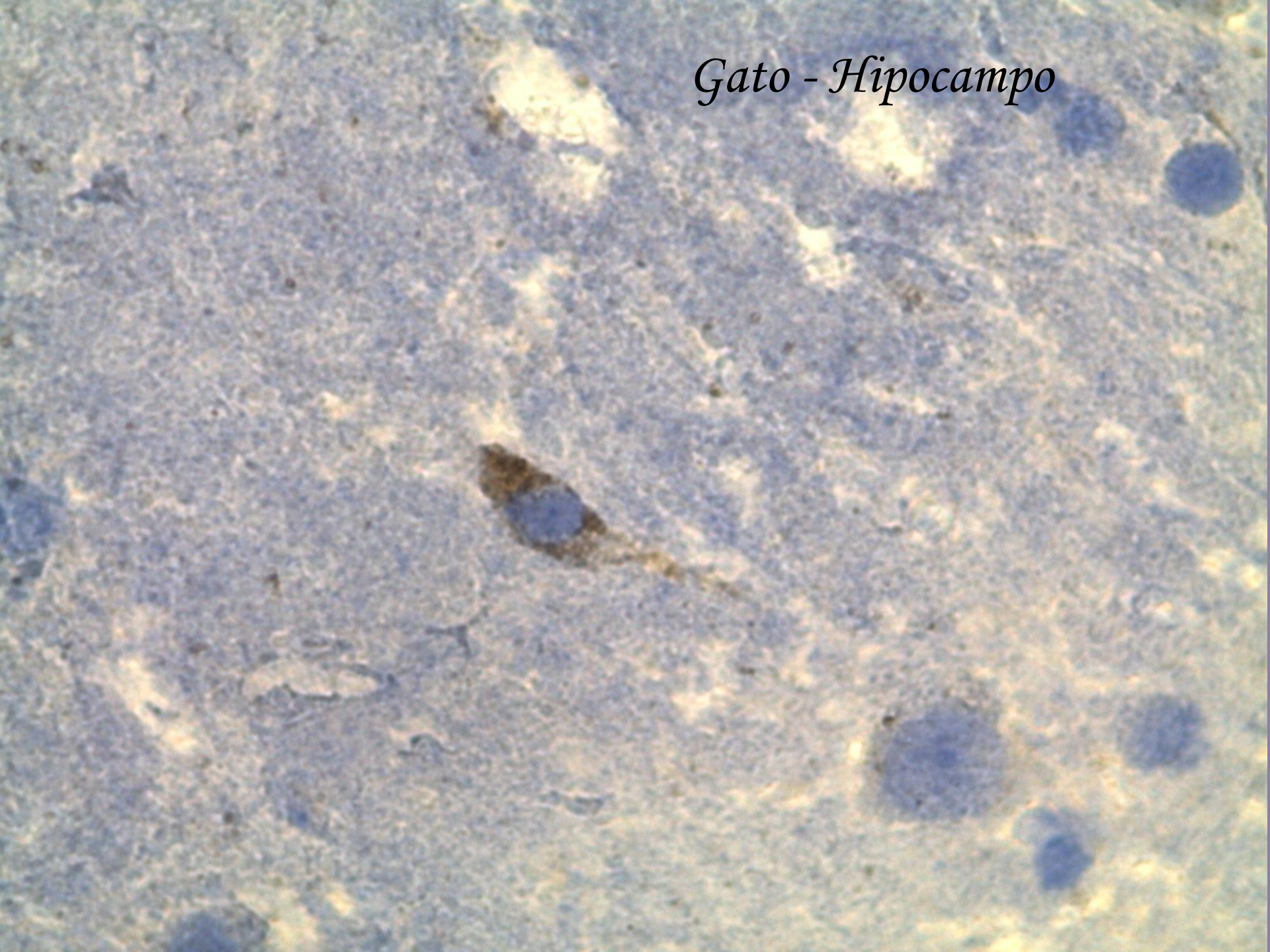
Bovino – Tronco encefálico



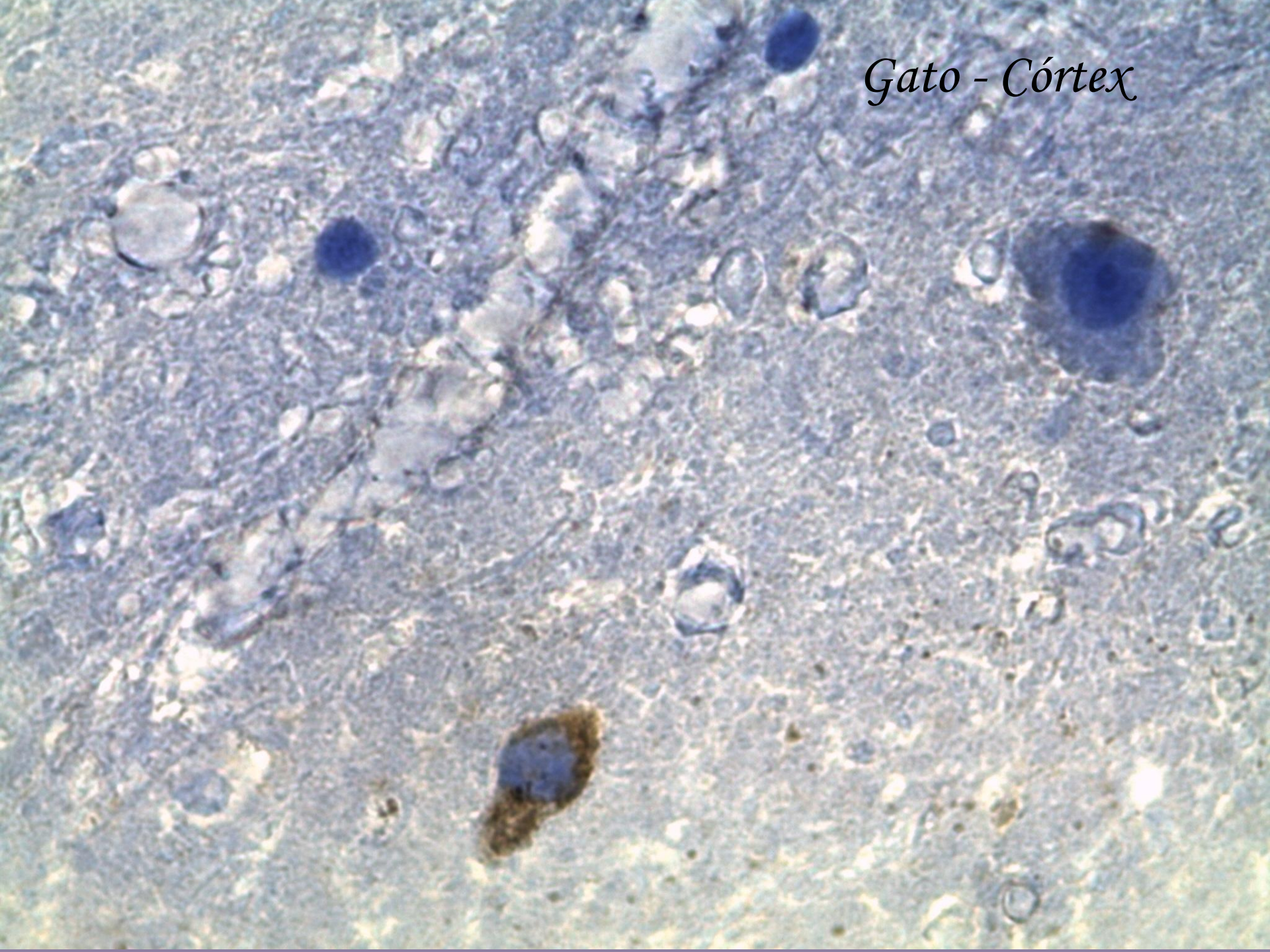
Equino - CórteX



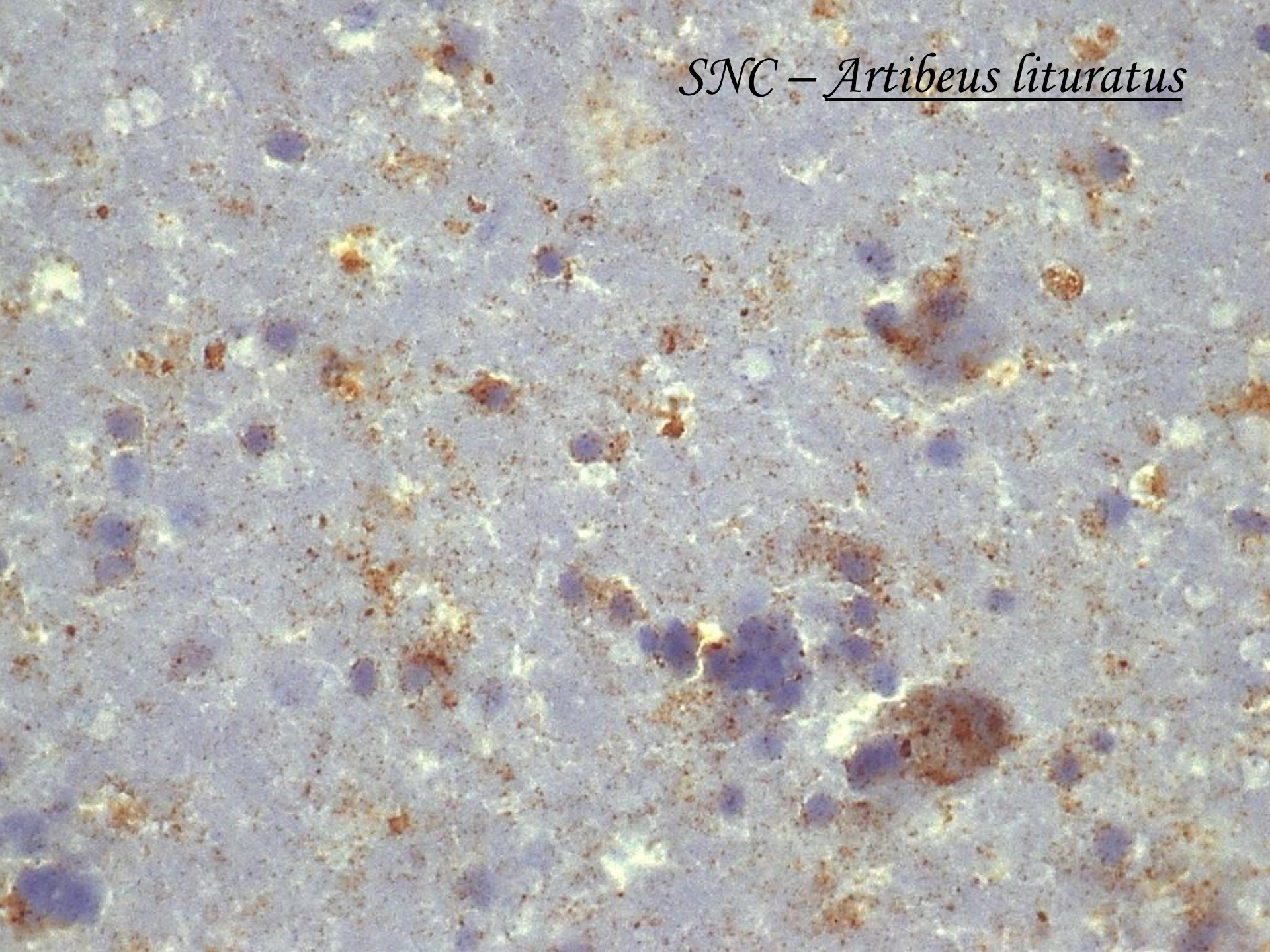
Gato - Hipocampo



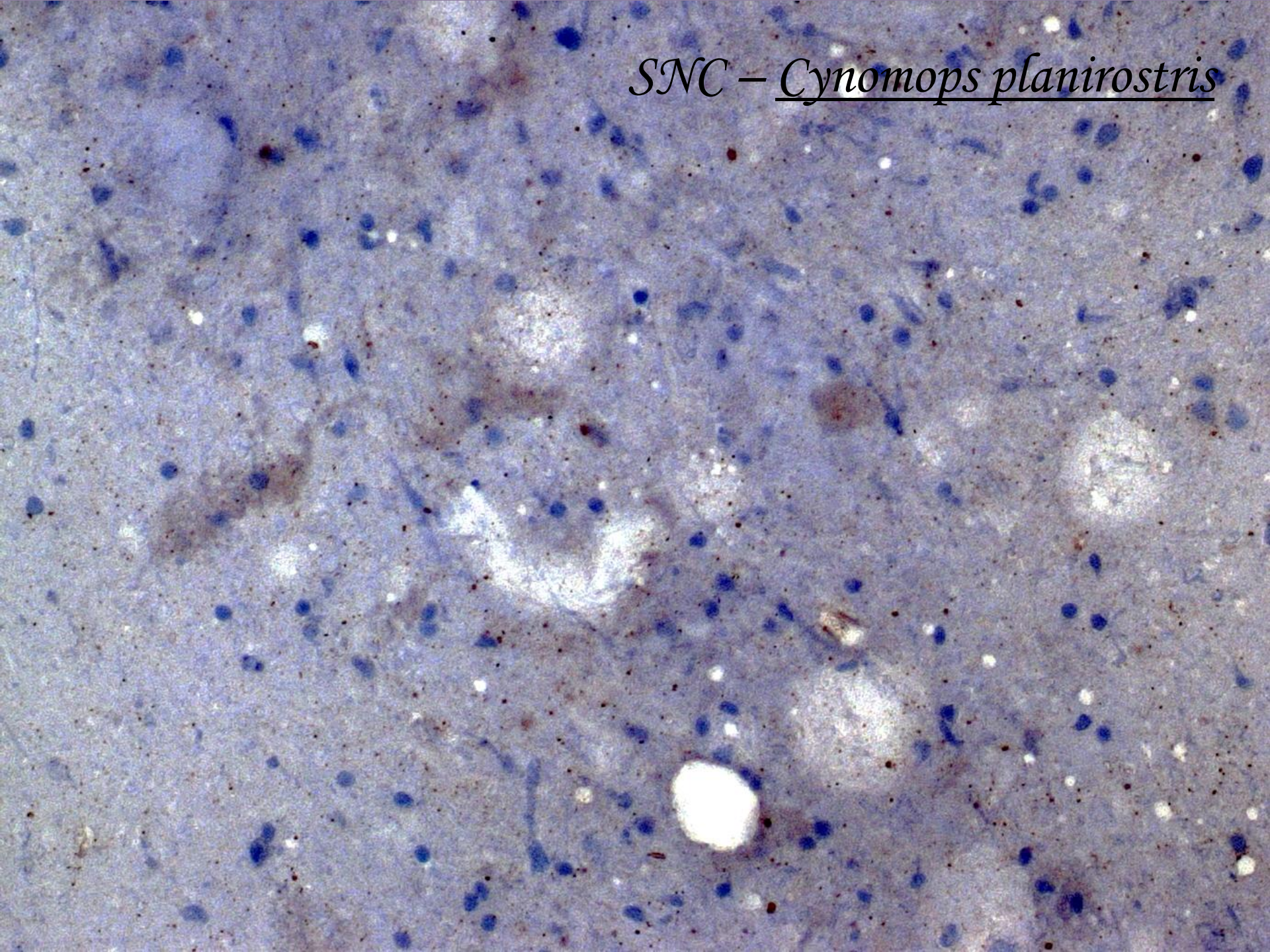
Gato - Córtex



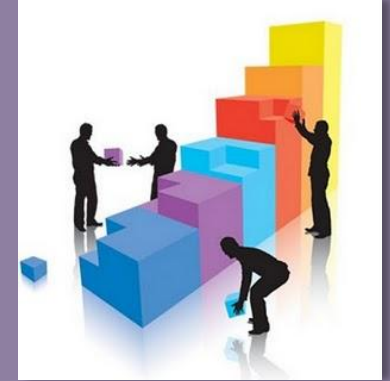
SNC – Artibeus lituratus



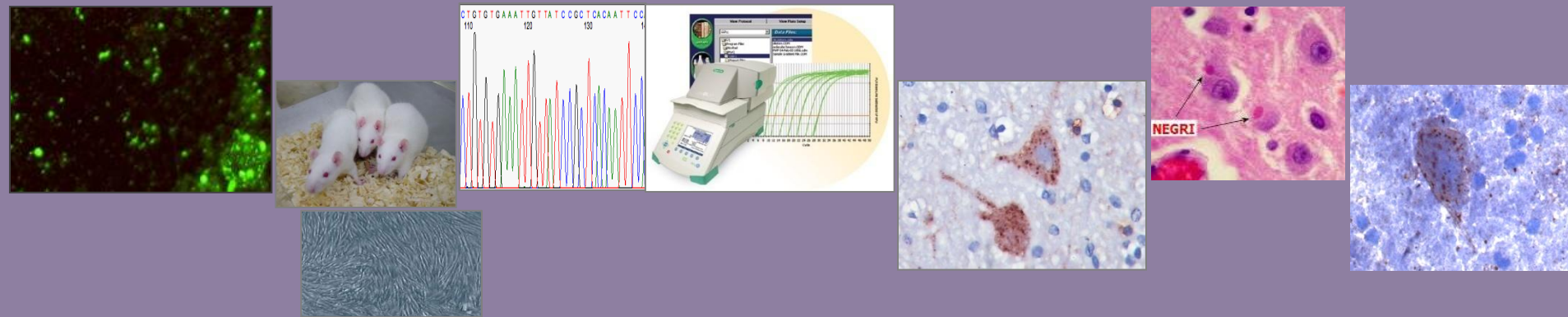
SNC – Cynomops planirostris



Próximas etapas



- ✓ Avaliação dos resultados da leitura das lâminas – técnica de IFD e teste rápido de IHQ
 - ✓ Análise estatística dos dados
- ✓ Elaboração do artigo para submissão à publicação



***Instituto Pasteur** - Centro de referência nacional e internacional no controle e vigilância da raiva e, mais recentemente designado como um centro colaborador da OMS, onde dentre suas ações, deve colaborar no diagnóstico da raiva em humanos e em animais e, no treinamento para este diagnóstico, é de suma importância o aprimoramento, a inovação e/ou a implementação de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos.*



VIII Seminário do Dia Mundial contra a Raiva

*Grata pela atenção,
Fernanda Guedes*

Laboratórios de Imuno-histoquímica e Sorologia – Instituto Pasteur

e-mail: fgluiz@pasteur.saude.sp.gov.br



*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende
o que ensina”.*

Cora Coralina