

DEMONSTRAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA EM TECIDO HEPÁTICO PRÉ-TRATADO COM TRIPSINA

HERMANN GONÇALVES SCHATZMAYR, ORTRUD MONIKA BARTH
& ALEXANDRE ALBERTO DE ALENCAR

Neste trabalho descreve-se uma prova de imunofluorescência direta (IFD), com o mesmo material de fragmentos de tecido hepático, fixados em formol, obtidos de casos suspeitos de infecção por febre amarela e utilizados para a histopatologia; um conjugado fluorescente foi preparado com soro de macacos sem anticorpos para hepatite A e B, previamente inoculados com a amostra vacinal 17D de febre amarela.

São considerados positivos para febre amarela por esta técnica os casos que apresentaram fluorescência citoplasmática de seus hepatócitos, após um tratamento prévio do tecido com tripsina a 0,1% por 2 horas a 37°C.

Em 76 casos estudados, 33 considerados positivos e 34 considerados negativos na histopatologia apresentaram resultados concordantes com a reação de imunofluorescência, de 9 casos com diagnóstico duvidoso, 8 foram negativos e 1 apresentou-se positivo na prova da IFD.

Materiais obtidos de casos de hepatite e de tecidos hepáticos normais foram sempre negativos na IFD para febre amarela; utilizou-se como controle positivo, células em cultura de linhagem Vero, infectadas com a mesma amostra 17D, as quais mostraram intensa fluorescência específica.

A técnica descrita mostrou-se de utilidade, como uma reação específica, em complemento aos estudos patológicos, em especial no diagnóstico de casos duvidosos, com a vantagem de utilizar o mesmo material previamente fixado em formol, recebido rotineiramente pelos laboratórios responsáveis pelo diagnóstico de febre amarela no país.

O diagnóstico laboratorial da febre amarela é realizado através a histopatologia de fragmentos de tecido hepático, segundo os trabalhos clássicos de Rocha Lima (1928, 1929) e Montenegro (1938, 1939) mais recentemente revisto por Panthier (1970), o isolamento de vírus e a demonstração de anticorpos no sangue do paciente (Monath et al., 1981). Destes métodos, a histopatologia é a única largamente utilizada, principalmente com os espécimens coletados por viscerotomia, sistema estabelecido nas áreas endêmicas da doença desde várias décadas. O material em formol é enviado aos laboratórios regionais responsáveis pelo diagnóstico. Reconhecia-se a necessidade de uma prova complementar em apoio ao diagnóstico histopatológico, considerando-se as dificuldades da metodologia da coleta e a própria apresentação de determinados espécimens à microscopia (Panthier, 1970). Em relação ao desenvolvimento de uma técnica por imunofluorescência indireta, semelhante à aplicada por Monath et al (1981) para soros humanos e por Huang, Minasian & More (1976) em fígados com hepatite B, a presente técnica de IF tem a vantagem de ser mais simples necessitando apenas do preparo de um reagente, podendo este conjugado específico ser mantido a -20°C por longo prazo.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimens

Cortes histopatológicos, a partir de blocos de parafina, contendo fragmentos de fígado, foram obtidos no Serviço de Patologia do Hospital Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz, do Instituto Evandro Chagas/Fundação SESP, Belém do Pará e da 8ª Enfermaria da Santa Casa da Misericórdia no Rio de Janeiro, os quais realizaram os diagnósticos histopatológicos prévios. A idade dos blocos era variada contando os mais antigos, cerca de dez anos. Os diagnósticos, histopatológico prévio e pela imunofluorescência somente foram comparados ao se completarem os exames de todos os espécimens.

Conjugado

Este reagente foi obtido por colaboração do Departamento de Imunologia do IOC, através conjugação de isotiocianato de fluoresceína à globulina obtida de dois macacos Rhesus da colônia da FIOCRUZ, os quais receberam duas inoculações subcutâneas da amostra vacinal 17D, com cerca de 2 meses de intervalo. Os animais foram testados previamente por radio-imunoensaio e demonstrada a ausência de anticorpos para hepatite A e B, por reativos comerciais (Laboratórios Abbott).

Para a conjugação, após precipitação pelo sulfato de amônio, concentração final de 33%, a globulina foi dialisada sucessivamente a 4°C contra NaCl 0,15M por 48 horas, tampão carbonato 0,05M, pH 8,1 por 24 horas, solução de isotiocianato de fluoresceína a 20mg por 200ml de tampão carbonato por 24 horas e finalmente tampão fosfato (PBS) por 5 dias, acompanhando-se o processamento pela densidade ótica a 495 e 280nm.

Método de imunofluorescência

Utilizou-se a técnica de Huang, Minassian & More (1976) modificada para fluorescência direta por Walker & Cain (1978). Em resumo, cortes de 4 μ de espessura são aplicados a lâminas de microscopia em água destilada a 40°C. Após a secagem completa, as lâminas podem ser guardadas ou processadas imediatamente; neste caso permanecem 1 hora a 60°C antes da desparafinização em banhos sucessivos de xilol. A hidratação foi feita em concentrações decrescentes de álcool e após curta passagem em água destilada, os cortes foram mantidos por 2 horas a 37°C em solução de tripsina a 0,1% em água destilada, à qual se adicionou CaCl₂ a 0,1%, elevando-se o pH a 7,8 com NaOH 0,1N. Após imersão em água destilada, os cortes permaneceram em PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente ou uma noite a 4°C. Aplicou-se em seguida o conjugado à lâmina, da qual se retirou antes o excesso de umidade. O conjugado testado previamente foi utilizado nas diluições 1:10 ou 1:20 em tampão de fosfato (PBS) pH 7,2. Após a aplicação do conjugado, as lâminas são incubadas a 37°C, por 30 minutos, em seguida lavadas duas vezes em PBS, mergulhadas rapidamente em água destilada e montadas em glicerina tamponada (9 partes de glicerol + 1 parte de PBS, pH 7,6). Os cortes foram observados com luz incidente de lâmpada de halogênio em microscópio Zeiss de fluorescência, com aumento de 40 vezes.

Controles

Como controle utilizaram-se células da linhagem Vero não infectadas, cortes de fígados normais e de casos de hepatite B, os quais não apresentaram fluorescência. Foram ainda utilizadas células Vero infectadas com a amostra vacinal 17D, 48 a 72 horas previamente, nas quais se observou fluorescência intracitoplasmática; esta fluorescência das células em cultura foi comprovada como sendo específica para febre amarela quando as células infectadas, após a fixação pela acetona a 4°C, foram expostas a soro humano contendo anticorpos para febre amarela, seguido da aplicação do conjugado específico acima descrito ou de um conjugado fluorescente, anti-IgG humano. No primeiro caso a fluores-

cência está ausente por neutralização prévia e no segundo caso observou-se fluorescência específica, comprovando-se a presença de antígeno de febre amarela nas células Vero infectadas (Monath et al., 1981).

Coloração de fundo

A aplicação de azul de Evans na diluição de 1:10.000 e de preto de naftaleno a 0,1% junto ao conjugado, apresentaram resultado não satisfatório, ficando muito diminuída a fluorescência citoplasmática específica.

Cortes histopatológicos

Os cortes dos mesmos espécimens foram corados pela hematoxilina-eosina para a análise histopatológica e no caso dos espécimens procedentes do Hospital Evandro Chagas e da Santa Casa, adicionalmente pela orceína, como confirmação do diagnóstico de hepatite B.

RESULTADOS

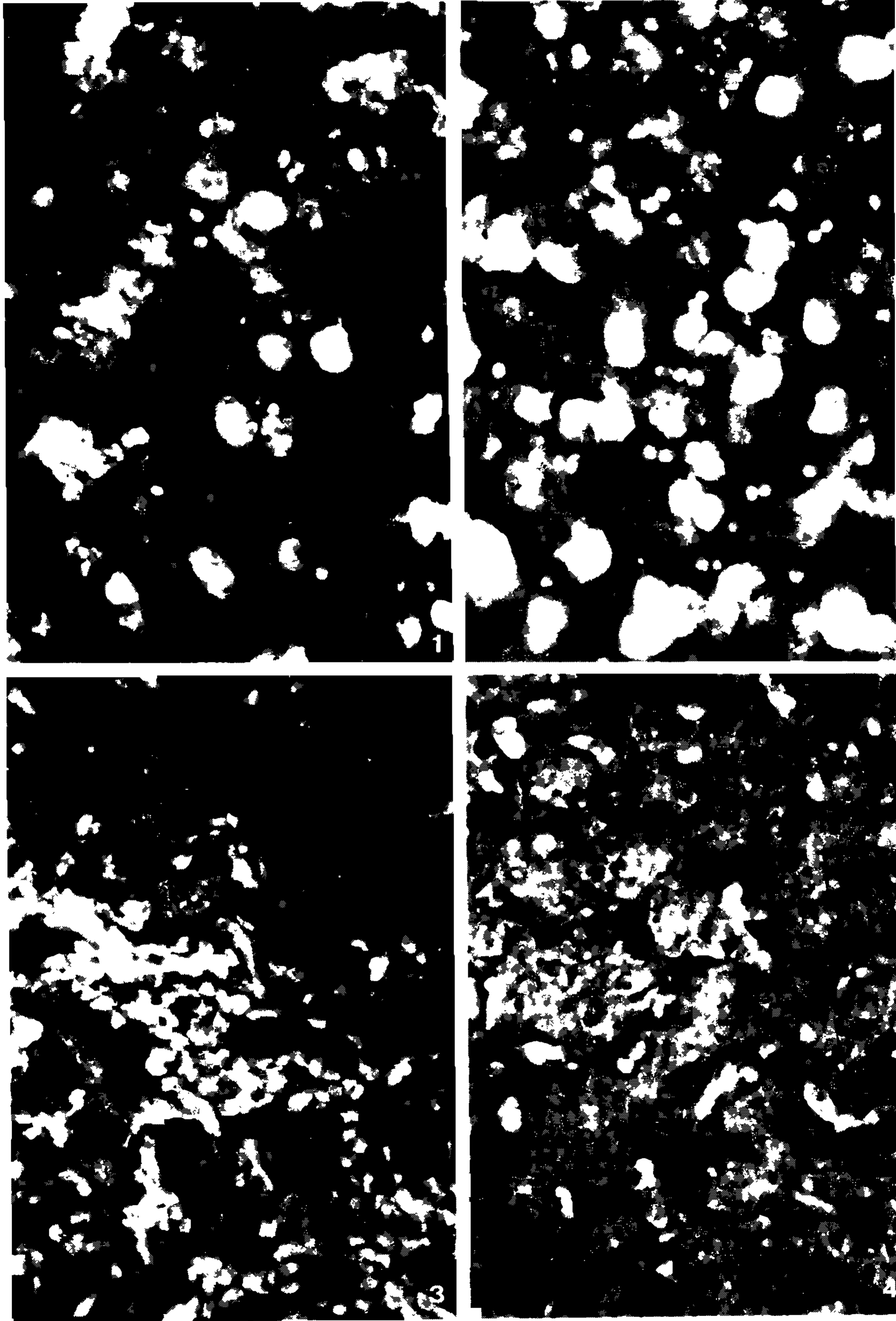
Os 76 casos estudados, 72 dos quais previamente examinados por Barth, Schatzmayr & Alencar (1982), incluíam espécimens provenientes de pacientes de febre amarela e hepatite B, sendo os resultados finais obtidos apresentados na Tabela I. Verificou-se total concordância em 88% dos casos, ficando os 12% restantes limitados aos 9 casos em que houve dúvidas ao diagnóstico positivo histopatológico e que, exceto um, foram negativos na imunofluorescência. Consideram-se positivos pela imunofluorescência os espécimens com definida fluorescência citoplasmática nos hepatócitos (Figs. 1 e 2), mesmo quando limitada a poucas células e algumas áreas do corte; observou-se por outro lado fluorescência, às vezes intensa, nos linfócitos, células de Councilman e da reticulina, todas porém consideradas não específicas e sem valor de diagnóstico (Panther, 1970).

TABELA I

Comparação entre os resultados de histopatologia (HP) e a reação de imunofluorescência direta (IFD) para febre amarela

<i>Espécimens positivos por HP e IFD</i>	<i>Espécimens duvidosos por HP e negativos por IFD</i>	<i>Espécimen duvidoso por HP e positivo por IFD</i>	<i>Espécimens negativos em ambos os métodos</i>
33 casos	8 casos	1 caso	34 casos

A fluorescência dos linfócitos varia bastante de caso para caso. Em alguns casos negativos (Fig. 3 e 4) fluorescem apenas os linfócitos. Nos casos positivos os linfócitos, em geral, apresentam uma fluorescência intensa, podendo no entanto ser a mesma negativa, em especial no interior dos vasos ou ainda apresentam uma fluorescência de tom amarelado. As células de Councilman possuem, por sua natureza densa, uma autofluorescência a qual é intensificada com a aplicação do conjugado específico nos casos positivos. A reticulina dos espaços de Disse apresenta freqüentemente uma fluorescência inespecífica muito intensa. Assinale-se ainda a possibilidade de fluorescência nuclear dos hepatócitos, a qual é igualmente considerada não específica bem como uma fluorescência generalizada, quando se trata de cortes de espessura excessiva, acima de 4 μ e que não devem ser utilizados.



Figs. 1-4 – Immunofluorescência direta com conjugado específico de febre amarela sobre cortes histológicos de tecido hepático humano (400x).

Figs. 1 e 2 – Casos positivos para febre amarela.

Figs. 3 e 4 – Casos negativos para febre amarela, notando-se intensa fluorescência inespecífica de linfócitos; na Fig. 4 observa-se um corte histológico mais espesso do que 4μ , resultando em uma fraca fluorescência generalizada de todo tecido.

A digestão pela tripsina foi estudada em função do seu tempo de duração e a fluorescência observada, sendo os resultados apresentados na Tabela II, onde se deduz que nas condições de trabalho apresentadas, o tempo de duas horas foi o mais adequado.

TABELA II

Relação entre o tempo de digestão a 37°C pela tripsina a 0,1% e a fluorescência observada em espécimens positivos para febre amarela

<i>Tempo de digestão</i>	<i>Fluorescência observada</i>
30 minutos	Generalizada não específica
2 horas	Limitada ao citoplasma dos hepatócitos, células de Councilman, linfócitos e reticulina
4 horas	Tecido parcialmente destruído
16 horas	Tecido completamente destruído

DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial da febre amarela através as lesões hepáticas é bem reconhecido, embora dúvidas possam surgir em determinados casos. A técnica apresentada, adiciona um componente específico pela reação imunológica entre o conjugado e o antígeno do vírus, mesmo em se tratando de espécimens fixados e emblocados após vários anos. A técnica direta, por nós aplicada, tem a vantagem de necessitar de um único reagente, o qual pode ser preparado em um laboratório e distribuído a todos os demais envolvidos no diagnóstico de febre amarela no país. A possibilidade por nós comprovada da utilização do mesmo material que se envia à histopatologia, é fundamental à implantação da técnica, permitindo ao patologista manter uma rotina confirmatória ou aplicar a imunofluorescência nos espécimens que julgar necessário; deve ser levado em conta, segundo Panthier (1970) que o exame microscópico histopatológico confirma ou elimina a diagnose de febre amarela em casos típicos porém os demais casos podem ter interpretação diferentes.

O tratamento dos cortes com tripsina constitui a fase inicial do método; o tempo de 2 horas por nós determinado como o mais adequado para a digestão do tecido hepático fixado, tem seu correspondente, em casos de hepatite, com o estudado por Huang, Minassian & More (1976). Já para outros tecidos, como por exemplo, o renal (Walker & Cain, 1978), o tempo de digestão é diferente. A concentração da tripsina está em relação inversa com o tempo de digestão, como foi testado por Greenlee & Keeney (1982) em tecido de pulmão infectado; a melhor concentração encontrada por estes autores, foi a de 0,4%, para 30 minutos de digestão a 37°C, enquanto Chandler & Gorelkin (1983) em tecido pulmonar e pancreático, na pesquisa de antígenos de adenovirus, utilizaram solução de tripsina a 0,25%, por 1 hora a temperatura ambiente. A utilização de material fixado e incluído em parafina para reação de imunofluorescência, através pré-tratamento com tripsina vem encontrando aplicação crescente em virologia, em especial como método retrospectivo de diagnóstico (Johnson, Swoveland & Emmons, 1980).

Dos nove casos com diagnóstico histopatológico duvidoso, quatro apresentaram-se como sendo de hepatite viral muito grave, mas sem características histopatológicas definidas de febre amarela e os demais foram considerados como prováveis casos de febre amarela, embora com lesões não muito típicas. A utilização mais ampla da metodologia aqui descrita e estudos epidemiológicos dos casos, são reconhecidamente necessários e devem ser estabelecidos em colaboração com os responsáveis pelo diagnóstico desta virose, de renovado interesse no país.

SUMMARY

A direct immunofluorescence staining technique is described for the detection of yellow fever virus antigen in formalin-fixed liver tissue. Fluorescein-labelled antibody was prepared with batches of immunoglobulin from monkeys immunized with yellow fever strain 17D and show to be free of antibodies to hepatitis A and B viruses. Liver sections were digested with 0.1% trypsin for 2 hours before staining with the fluorescent conjugate. All specimens with hepatocytes showing cytoplasmatic fluorescence were considered positive.

In 76 specimens tested there was agreement between histopathology and immunofluorescence in 33 positive and 34 negative cases. Of the remaining 9 specimens with doubtful histopathology, 8 were negative and 1 was positive by immunofluorescence.

Specimens from hepatitis of other aetiologies were always negative. Tissue culture cells (VERO) infected with yellow fever virus strain 17D gave strongly positive reactions.

The technique described is a useful addition to histopathology in cases of doubtful diagnosis and makes use of specimens routinely received for diagnosis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Biotécnica Selma Majerowicz o apoio na preparação dos espécimens, ao Dr. Alexandre da C. Linhares e colaboradores do Instituto Evandro Chagas e ao Dr. Figueiredo Mendes da Santa Casa do Rio de Janeiro, pelo envio das lâminas bem como aos colegas da Fundação Oswaldo Cruz, Drs. Roberto Mesquita, José P. Simonetti e Alberto Nicolau pelo interesse e colaboração em várias fases do trabalho. Agradecemos ainda a colaboração do Departamento de Imunologia do IOC (Dr. Bernardo Galvão) no preparo do conjugado, bem como ao Dr. Gilberto Teixeira/IOC, pela sugestão e estímulo iniciais na realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTH, O.M.; SCHATZMAYR, H.G. & ALENCAR, A., 1983. Determinação por imunofluorescência de antígenos da febre amarela. *Anais do XIX Congresso da Soc. Bras. Medicina Tropical* :153.
- CHANDLER, F.W. & GORELKIN, L., 1983. Immunofluorescence staining of adenovirus in fixed tissues pretreated with trypsin. *J. Clin. Microbiol.*, 17 :371-373.
- GREENLEE, J.E. & KEENEY, P.M., 1982. Immunofluorescence labelling on K-Papovavirus antigens in glycol methacrylate embedded material: a method for studying infected cell population by fluorescence microscopy and histological staining of adjacent sections. *Stain Technology*, 57 (4) :197-205.
- HUANG, S.; MINASSIAN, H. & MORE, J.D., 1976. Application of immunofluorescence staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab. Invest.*, 35 (4) :383-390.
- JOHNSON, K.P.; SVOVELAND, P.T. & EMMONS, R.W., 1980. Diagnosis of rabies by immunofluorescence in trypsin-treated histologic sections. *J. Am. Med. Assoc.*, 244 (1) :41-43.
- MONATH, T.P.; CROPP, E.B.; MUTH, D.J. & CALISHER, C.F., 1981. Indirect fluorescent antibody test for the diagnosis of yellow-fever. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75 (2) :282-286.
- MONTENEGRO, J., 1938. Uniformização dos diagnósticos histológicos da febre amarela. *Brasil-Med.*, 52 (3) :51-59.
- MONTENEGRO, J., 1939. A célula de Councilman-Rocha Lima no diagnóstico da febre amarela humana. *Arq. Hig. e Saúde Públ.*, 4 (5) :17-27.

PANTHIER, R., 1970. Yellow Fever. Em: DEBRÉ, R. & CELERS, J. *Clinical Virology*, 871 pp. W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto, 299-315.

ROCHA LIMA, H. da, 1928. O diagnóstico post-mortem da febre amarela. *Folha Med.*, 9 (18) :214-217.

ROCHA LIMA, H. da, 1929. Sobre a anatomia patológica da febre amarela. *Folia Clin. et Biol.*, 1 (1/2) :4-33.

WALKER, D.H. & CAIN, B.G., 1978. A method for specific diagnosis of Rocky Mountain spotted fever on fixed paraffin-embedded tissue by immunofluorescence. *J. Inf. Dis.*, 137 :206-209.