

19. Preparação de lâminas para o controle positivo e negativo de imunofluorescência

1. Preparar uma garrafa de células T-25 (pequena de plástico) com células para infectar 18-24 horas após.
2. Inocular uma alíquota de vírus com título de 10^4 a 10^6 TCID₅₀/ml. Incubar 1 hora à 37°C na estufa de CO₂. Agitar a garrafa a cada 15 minutos.
3. Remover o inóculo e acrescentar MEM com 1% de soro.
4. Observar o cultivo durante 24 a 48 horas após-inoculação para o aparecimento de efeito citopático característico.
5. Quando observado o efeito, remover o meio, tripsinizar as células e ressuspender com 3mL de MEM com 10% de soro. O ECP não pode estar numa fase muito avançada.
6. Selecionar as lâminas e identificar com um lápis. Pipetar uma gota (+/- 50µL/poço) nas lâminas multispot. Colocar células não infectadas como controle negativo.
7. Incubar na estufa de CO₂ a 37°C até as células tenham aderido à lamina (mínimo de 2h). Opcionalmente pode-se deixar incubando até o dia seguinte.
8. Fixar com acetona (100%) gelada por 5 minutos, lavar em PBS e água destilada e secar em temperatura ambiente.
9. Armazenar à -20°C.

20. Imunofluorescência (IFA)

1. Preparação do material para IFA:

a) *Imprint/Impressões de tecidos:*

- Preparar lâminas comuns de microscopia, previamente limpas e livres de resíduos de tecidos.
- Efetuar leves toques do tecido suspeito na lâmina permitindo a aderência de uma quantidade adequada de células (caso houver excesso de células, esse poderá ser limpo com leves toques de papel toalha sobre a lâmina, não havendo necessidade de sujar outra lâmina).
- Demarcar a área de impressão com esmalte de unha, evitando o gasto desnecessário de reagentes.

b) *Suabes de tecido:*

- Preparar lâminas *multispot* previamente limpas e livres de resíduos de tecidos.
- Os suabes, adequadamente armazenados em eppendorfs com 1mL MEM 2X devem ser drenados (pressionando contra as laterais do eppendorf) disponibilizando um número adequado de células.
- Centrifugar durante 5 minutos a 3500 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet resultante em MEM + 10% de soro.
- Incubar de 50-100µL da suspensão por poço da lâmina *multispot* durante 2h em estufa de CO₂, à 37°C.

c) *Cultivo Celular:*

- Preparar lâminas *multispot* previamente limpas e livres de resíduos de tecidos.
- Adicionar tripsina ao cultivo celular, para a individualização das células.
- Adicionar ao cultivo solução de MEM + 10% de soro.
- Incubar de 50-100µL da suspensão por poço da lâmina *multispot* durante

2h em estufa de CO₂ à 37°C, para formação de monocamada.

2. Fixar as lâminas em acetona gelada (4°C) por cinco minutos, para possibilitar a formação de poros na membrana celular que permitirão o reconhecimento dos antígenos pelo anticorpo.
3. Lavar as lâminas em PBS e posteriormente em água destilada com movimentos suaves para evitar que o tapete se descole.
4. Preparar um estojo com papel toalha úmido para evitar o ressecamento das lâminas na fase posterior onde será adicionado o anticorpo
5. Secar as lâminas à temperatura ambiente ou com auxílio de secador. Não utilize temperaturas altas.
6. No caso de IFA indireta, incubar as lâminas com o Anticorpo primário, em quantidade suficiente para cobrir o poço por 1h em estufa à 37°C; já na IFA direta incubar com o anticorpo já conjugado com a FITC nas mesmas condições.
7. Lavar as lâminas em PBS e posteriormente em água destilada com movimentos suaves.
8. Secar as lâminas à temperatura ambiente ou com auxílio de secador.
9. Em caso de IFA indireta, incubar com Anticorpo secundário suficiente para cobrir o poço, por 1h em estufa à 37°C.
10. Lavar as lâminas em PBS e, posteriormente, em água destilada com movimentos suaves.
11. Secar as lâminas à temperatura ambiente ou com auxílio de secador.
12. Corar as lâminas com corante negativo: *Evans Blue* durante 5 minutos.
13. Lavar as lâminas em PBS e posteriormente em água destilada com movimentos suaves.
14. Secar as lâminas à temperatura ambiente ou com auxílio de um secador.
15. Montar as lâminas adicionando uma gota de PBS+glicerol. Colocar uma lamínula sobre a gota.
16. Realizar a leitura das lâminas em microscópio de epifluorescência.

OBS.:

- Paralelamente ao preparo da lâmina com o material teste deve-se obrigatoriamente corar uma lâmina controle com material sabidamente positivo para o vírus suspeito.
- As lâminas que servirão como controles positivos são previamente preparadas e armazenadas à -20°C.