

USO VETERINÁRIO

DESCRIÇÃO: Os reagentes contidos no kit são utilizados no teste de imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB). Cada kit contém reagentes em quantidade suficiente para testar 120 (cento e vinte) amostras de campo.

PRINCÍPIO DO TESTE: O teste de imunodifusão em gel de ágar é um método altamente específico na detecção de anticorpos para VLB em soro bovino. O princípio do teste é a migração simultânea do antígeno (Ag) e do anticorpo (Ac) presente nas amostras positivas, através do gel de ágar. Uma linha ou banda de precipitação formar-se-á onde a concentração de ambos, Ag e Ac, estiver em equilíbrio (figura 1). Esta reação pode ser afetada pelos seguintes fatores:

- * Concentração do antígeno e anticorpo;
- * Concentração eletrolítica no gel;
- * pH;
- * Temperatura ambiente;
- * Nível de lipídios na amostra e
- * Umidade.



Figura 1

INFORMAÇÃO GERAL: O antígeno é elaborado a partir do meio de cultivo das células FLK (Fetal Lamb Kidney) cronicamente infectadas pelo VLB, devendo ser utilizado somente em diagnóstico "in vitro" na detecção de anticorpos específicos para Leucose Enzoótica Bovina. Estes resultados aparecem no soro de 8 a 12 semanas após a infecção. Por isso, um resultado negativo indica a ausência da infecção pelo VLB 12 semanas antes da colheita da amostra. É muito importante isolar os animais negativos de todas as possíveis fontes de infecção e retestá-los em intervalos regulares de 12 semanas até que dois testes negativos consecutivos sejam obtidos, antes de se considerar um plantel negativo. Geralmente, aceita-se que animais infectados com VLB são portadores do vírus pelo resto da vida. Porém, um resultado positivo não significa a presença do tumor ou que a formação tumoral irá ocorrer no animal.

SENSIBILIDADE: 95%

ESPECIFICIDADE: 91%

RECONSTITUIÇÃO DOS REAGENTES:

1) ANTÍGENO (Ag):

- * Adicionar 1ml de diluente estéril ao frasco de antígeno liofilizado.
- * Deixar o produto em geladeira por 1 hora para a completa ressuspensão do liofilizado. Caso isto não ocorra neste período, deixar 24h em geladeira.

2) SORO CONTROLE POSITIVO (SCP):

- * Adicionar 1ml de diluente estéril ao frasco de soro controle positivo liofilizado.
- * Deixar o produto em geladeira por 1 hora para a completa ressuspensão do liofilizado. Caso isto não ocorra neste período, deixar 24h em geladeira.

CONSERVAÇÃO E VALIDADE DOS REAGENTES:

1) REAGENTES LIOFILIZADOS:

- * Conservar entre 2°C a 8°C. Nesta temperatura os reagentes permanecerão estáveis até a data de expiração indicada no rótulo.

2) REAGENTES RECONSTITUÍDOS:

- * Devem ser alíquotados e as alíquotas conservadas abaixo de -18°C, evitando assim, múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento. Descongelar somente a quantidade de reagentes necessários para as provas a serem executadas. Após descongelar, manter entre 2°C e 8°C.

PRECAUÇÕES:

- * O Ag e o SCP que compõem o kit foram padronizados e devem ser usados em conjunto.
- * Todo o material biológico (Ag, SCP e soros a serem testados) deve ser devidamente homogeneizado antes do início do teste.
- * Enquanto se realiza o teste, manter os reagentes, Ag e SCP, em banho de gelo e não permitir que as amostras teste permaneçam à temperatura ambiente por muito tempo.
- * Os reagentes e os materiais utilizados no teste devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir a Leucose Enzoótica Bovina.

PROCEDIMENTO DO TESTE:

1) Preparação do gel de ágar

a) O tampão de imunodifusão para Leucose Bovina é preparado misturando-se:

- NaCl..... 42,5g
- KCl..... 0,1g
- Na₂HPO₄ (anidro).....0,6g
- KH₂PO₄..... 0,1g
- EDTA dissódico..... 0,186g
- NaN₃(azida sódica)..... 0,05g
- Água destilada q.s.p.500ml

Agitar até a completa dissolução. Ajustar o pH para 7,3 com solução de NaOH a 1N. Conservar a 4°C;

b) Dissolver 0,9g de ágar Noble em 100ml de tampão de imunodifusão para leucose bovina. Ferver esta solução em banho maria até que o ágar se dissolva por completo, não devendo a mesma ser usada se apresentar grânulos ou flocos não dissolvidos.

c) **PLACA DE PETRI** - Usar placas de Petri de vidro com 50mm de diâmetro, livre de ranhuras.

- Adicionar 5ml de ágar a 0,9% ainda quente a cada placa. A placa deverá estar em superfície completamente plana.

- As placas de ágar não cortadas podem ser conservadas com as tampas para baixo por até 24 horas entre 2°C e 8°C, dentro de uma câmara úmida. Antes do uso, verificar se o ágar armazenado não está ressecado ou coberto por umidade.

d) **LÂMINA DE VIDRO** - Também pode-se distribuir 4,5 ml de ágar quente em lâmina de vidro 25x76mm. As lâminas deverão estar em superfície plana.

- Após solidificação do ágar, usá-las imediatamente ou armazená-las em geladeira, acondicionadas em caixa bem vedada com ambiente úmido. Deve-se utilizá-las em 24 horas.

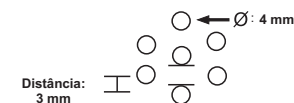


Figura 2

2) Perfuração dos poços no ágar:

- a) É usado um cortador padrão com 7 (sete) furadores de 4mm de diâmetro, distanciados no máximo 3 mm entre si. A figura 2, mostra a disposição dos furadores, sendo um central e seis periféricos.
- b) Cortar o ágar somente após o mesmo estar suficientemente solidificado, a fim de evitar fragmentação das bordas no momento da retirada dos cilindros de ágar.
- c) Remover por sucção o cilindro de ágar e a umidade residual de cada poço, usando uma ponteira conectada a uma bomba a vácuo.
- d) Usar as placas imediatamente após o corte.

Obs.: Antes de adicionar os reagentes e as amostras, verificar o gel de ágar, que deve estar aderido ao fundo da placa/lâmina.

3 - Adição dos reagentes e incubação das placas/lâminas:

- Os soros a serem testados são colocados em poços alternados ao redor do poço central em um volume aproximado de 25 microlitros por poço, utilizando-se uma micropipeta e ponteiros individuais. Um total de três amostras de soro pode ser testado em cada conjunto de 7 poços. Todos devem ser preenchidos. No caso de haver menos de 3 amostras a testar, preencher o(s) poço(s) remanescente(s) com um dos soros teste.
 - O SCP (aproximadamente 25 microlitros por poço) é colocado com micropipeta e ponteira em ambos os lados de cada soro a ser testado.
 - O poço central é preenchido com cerca de 25 microlitros do Ag, colocado com micropipeta e ponteira.
- Obs.: Tanto os reagentes como os soros teste devem preencher os poços até o nível da superfície do ágar sem deixar menisco.
- Cobrir as placas/lâminas e deixá-las em repouso durante alguns minutos antes de movimentá-las, reduzindo possibilidade de derramamento do Ag e soros pela superfície do ágar.
 - Incubar à temperatura ambiente (20°C a 25°C) em câmara úmida.

4 - Leitura e interpretação do teste:

- A leitura do teste deve ser feita em ambiente escuro com o auxílio de um foco de luz forte, em feixo estreito, ajustável para intensidade e posições variáveis, a fim de verificar o aparecimento das linhas de precipitação nas placas/lâminas. A reação deve ser observada contra um fundo preto.
- As linhas de precipitação aparecem após 24 a 72 horas, dependendo da concentração de anticorpos da amostra. Portanto, é conveniente ler os resultados do teste depois de 24, 48 e 72 horas de incubação.
- O SCP é a base para a leitura do teste. Se não houver a formação de uma linha de precipitação nítida (linha de controle), a prova não é válida e precisa ser repetida, levando-se em conta os fatores que afetam o teste (ver princípio do teste).
- O tipo de reação irá variar conforme a concentração de anticorpos na amostra que está sendo testada. São observados os seguintes tipos de reações:
 - NEGATIVA não há formação de linha de precipitação entre o poço central que contém o Ag do VLB e o poço com uma amostra negativa. As linhas de controle se prolongam para dentro do poço contendo uma amostra negativa, sem se curvarem ou com uma ligeira curvatura em direção ao SCP (ver figura 3).

II. POSITIVA há formação de uma linha de precipitação entre o poço central que contém o Ag do VLB e o poço com uma amostra positiva. Esta linha une-se com as linhas de controle e forma uma linha contínua de identidade específica, conforme mostra a figura 3.

III. FRACAMENTE POSITIVA as linhas de controle se prolongam em direção ao poço com uma amostra fracamente positiva; próximo a este, elas curvam-se ligeiramente em direção ao poço central com o Ag, mas não prosseguem para formar uma linha contínua entre o poço do Ag e o poço contendo a amostra fracamente positiva, a qual apresenta um baixo título de anticorpos (figura 3). Esta reação é mais difícil de detectar, sendo facilmente despercebida. Todas as mostras fracamente positivas devem ser novamente testadas antes de se relatar os resultados. Uma reação fracamente positiva pode ocorrer se houver difusão de qualquer soro positivo sob a camada de ágar para um poço com um soro negativo. Este erro seria identificado em um novo teste.

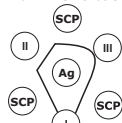


Figura 3

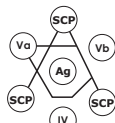


Figura 4

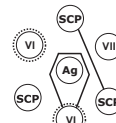


Figura 5

IV. FORTEMENTE POSITIVA as linhas de controle inclinam-se em direção ao corpo central (Ag) antes de alcançar o poço contendo a amostra fortemente positiva, continuando como uma linha difusa situada próximo ao poço do Ag (figura 4). Esta reação indica que a concentração de anticorpos na amostra é elevada.

V. INESPECÍFICA observa-se uma linha de precipitação entre o poço do Ag e o poço da amostra que está sendo testada. Entretanto, esta linha inespecífica não forma uma linha contínua com as linhas de controle, (observar figura 4 - Va). Entre as linhas de controle e a linha inespecífica forma-se um ângulo mais agudo do que aquele formado com a linha específica de identidade com a Leucose Enzoótica Bovina. A formação desta linha inespecífica deve-se a outras reações Ag-Ac que não a de Leucose Enzoótica Bovina. No entanto, algumas vezes, duas linhas, uma específica para a Leucose Enzoótica Bovina e outra inespecífica, podem ocorrer em uma mesma amostra (figura 4 Vb). Por isso, deve-se ter cuidado ao analisar uma linha inespecífica, a qual pode estar obscurecendo uma reação específica para a Leucose Enzoótica Bovina. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada e a reação observada a intervalos freqüentes, o que pode tornar mais fácil determinar se a mesma é positiva ou negativa.

VI. TURVAÇÃO AO REDOR DO POÇO associa-se a uma alta concentração de lipídios na amostra que está sendo testada, o que pode obscurecer a reação. Deve-se repetir o teste com uma nova amostra de soro do animal em questão (ver figura 5).

VII. DUAS LINHAS DE PRECIPITAÇÃO associa-se a um segundo Ac para o VLB presente na amostra que está sendo testada (figura 5).

OBS.: Todos os componentes utilizados na realização do teste deverão ser colocados em solução desinfetante antes de serem descartados.

ATENÇÃO: Qualquer desvio das instruções apresentadas pode trazer resultados não confiáveis.

CONSERVAÇÃO: Conservar à temperatura de 2°C a 8°C.

APRESENTAÇÃO:

Cada kit é composto por:

- * 1 (um) frasco ampola de antígeno liofilizado,
- * 3 (três) frascos ampola de soro controle positivo liofilizados e
- * 1 (um) frasco ampola com 4,0 ml de diluente estéril.

VENDA EXCLUSIVA A MÉDICO VETERINÁRIO

REFERÊNCIAS:

- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M. J. Serologic detection of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Microbiology*, n.1, p. 195-2002, 1976.
- FERREIRA, M.I.C; ROMERO, C.H. Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placas e em lâminas na detecção de anticorpos contra o vírus da Leucose Enzoótica Bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, N. 2, 49-53, 1982.
- Committee on Bovine Leukemia of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians: Protocol for the immunodiffusion test for bovine leukemia virus, in *Proceedings, 23rd Annual Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, 1-7, 1980.

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº 7916/2001, em 04/09/2001

Responsável Técnico: Médica Veterinária Giselle Almeida Nocera Espírito Santo CRMV-PR nº5633

Proprietário e Fabricante:

TÊCPAR

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ

Rua João Américo de Oliveira 330 CURITIBA- PR

CNPJ 77.964.393/0005-01

Governo do Estado do Paraná

SAC 0800 6451725 - sac@tecpa.br