

Embrapa

FL
02733

Caprinos

***Kit Diagnóstico
da Artrite
Encefalite Caprina***



INFORMAÇÕES GERAIS

Este teste detecta anticorpos precipitantes no soro sanguíneo de caprinos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAE). A microimunodifusão em gel de agarose (MIDGA) consiste na difusão de antígeno e anticorpo em gel de agarose, de forma a possibilitar o encontro de ambos. Essa reação resulta na precipitação do conjunto, visível no gel, na forma de uma linha.

CONTEÚDO DO KIT

1 frasco de antígeno	1,0 mL
1 frasco de soro referência positivo	3,0 mL
1 frasco de soro referência negativo	3,0 mL

CUIDADOS

Conservar em temperatura de 2°C a 8°C. Os reagentes contêm 0,01% de azida sódica. Usar equipamentos e vidrarias limpos para evitar contaminação dos reagentes.

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE

Placa aquecedora ou forno de microonda, balança, pipetas, micropipetas, refrigerador, bomba de vácuo, embalagem plástica tipo tupperware (câmara úmida); foco de luz indireta.

MATERIAL E REAGENTES NECESSÁRIOS

1.1. Soro a ser testado – clarificado por centrifugação, se necessário, identificado individualmente com o número de controle do laboratório.

1.2. Antígeno padronizado - Produzido com cepa CAEV Cork. Rendimento: 1 ml de antígeno é suficiente para testar, aproximadamente 100 soros.

1.3. Lâminas de vidro (26 x 76 mm) - novas ou reutilizadas desde que sem arranhaduras e usadas somente para MIDGA, previamente desengorduradas em solução álcool-éter 50% por pelo menos 24 horas. No momento do uso, secar com gaze.

Lavagem das lâminas: deixar de molho em solução de detergente neutro por uma noite. Lavar uma a uma com esponja macia e enxaguar exaustivamente (cinco vezes) em água destilada. Deixar escorrer o excesso de água em suporte apropriado, individualmente para não manchar, e guardar em solução álcool-éter 50% até o momento do uso.

1.4. Perfurador em roseta - com um orifício central e seis periféricos, onde cada orifício tem diâmetro de 4,0 mm e distância entre eles de 3,0 mm.

Obs.: guardar em local protegido para não amassar ou danificar o diâmetro dos orifícios e, conseqüentemente, sua capacidade volumétrica.

1.5. Câmara úmida - com tampa, preferencialmente de vidro, com fundo recoberto de papel filtro umedecido com solução de azida sódica a 1%.

1.6. Tampão borato 0,1 M, pH 8,6

NaOH	2,0 g
NaCl	70,0 g
H ₃ BO ₃	9,0 g
Água bi-destilada (Milli-Q).....	920,0 ml

1.7. Ágar para MIDGA

Solução de azida sódica a 1%	1 ml
Tampão borato pH 8,6	100 ml
Agarose	1 g

Manter em ebulição por 30 minutos em banho-maria. Guardar em geladeira, em frascos com 50 ml lacrados com parafilme, para minimizar a evaporação.

TÉCNICA

Fundir o ágar por fervura ou em microondas (neste caso, pesar o frasco antes e depois, completando a eventual diferença acrescentando água destilada).

Sobre superfície nivelada, distribuir 4,7 ml de ágar por lâmina previamente desengordurada. Deixar gelificar e guardar em câmara umedecida por 12-24 horas para estabilização iônica.

Perfurar duas rosetas por lâmina (fig. 1), no momento do uso, observando para que os orifícios n. 1 e 4 fiquem na posição vertical. Retirar o ágar dos orifícios com auxílio de agulha fina ou bomba de vácuo, com cuidado para não danificar as bordas dos orifícios ou descolar o gel.

Obs.: não utilizar lâminas com mais de 24 horas de preparo, pois a retração observada no gel prejudica a difusão dos reagentes.

Homogeneizar os reagentes (soro e antígeno), verificar se não há umidade acumulada no orifício (se necessário, retirar com a micropipeta, antes de colocar o reagente), e utilizando micropipeta com ponteira individual, distribuir os reagentes no volume de 30l/orifício na seguinte seqüência: soro teste (três por roseta) nos orifícios periféricos nas posições 1, 3 e 5; soro padrão positivo nos orifícios periféricos nas posições 2, 4 e 6 das duas rosetas, e antígeno, no orifício central das duas rosetas.

Obs.: manter antígeno e soro padrão em banho de gelo.

Colocar as lâminas em câmara úmida a temperatura ambiente (25°C), cuidando para não haver excesso ou falta de umidade, que deve ser observada diariamente.

Leitura final em 72 horas, em luz indireta, sobre fundo escuro, observando, primeiro, as linhas do soro padrão positivo (2, 4 e 6), e a seguir do soro em teste, observando a ocorrência de linhas de precipitação com identidade com as do soro padrão. Linhas Observadas (fig. 2):

Reação positiva (P) - linha intermediária entre o soro e antígeno, unindo-se (com identidade) com a do soro padrão positivo adjacente.

Reação fracamente positiva (FP) - linha intermediária inexistente entre o soro e antígeno, mas com arqueamento da extremidade da linha de referência do soro padrão positivo adjacente em direção ao orifício do soro em teste FP.

Reação negativa (N) - ausência de linha intermediária entre o soro e antígeno. A linha de referência do soro padrão adjacente estende-se e termina no orifício do soro negativo.

Reações inespecíficas - formação de linhas de precipitação sem identidade com as do soro padrão. Somente efetuar a leitura (positivo ou negativo) se a reação inespecífica não impedir a visualização segura da ocorrência ou não de linha de precipitação específica entre o antígeno e o soro.

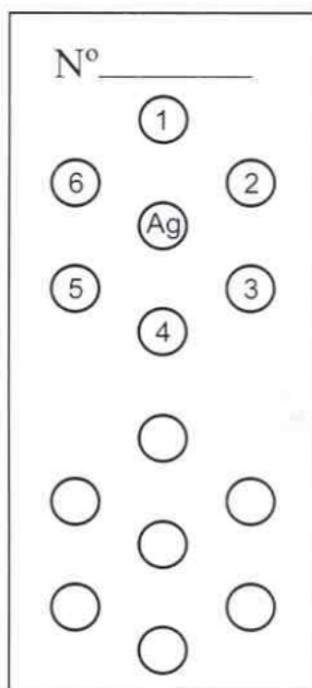


Fig. 1 - Distribuição dos soros e antígeno na lâmina.

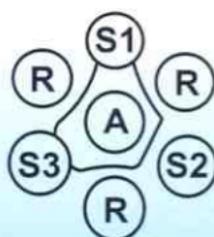


Fig. 2 - Linhas de precipitação antígeno-anticorpo (S1-Negativo, S2-Positivo, S3- Fraco-positivo e R- soro padrão positivo).

Embrapa - CNPC
SETOR DE INFORMAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO
REG. N.º FOL 02733
DATA 14 MARÇO 2008

Kit diagnóstico da Artrite

2007

FD - FOL 02733



20757-1

Apoio

**Banco do
Nordeste**



F U N C A P

Responsável Técnico

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Méd. Vet. / Pesquisador

Embrapa Caprinos

Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, km 04

CEP 62.010-970, Caixa Postal 145, Sobral - CE

Fone: (0xx88) 3677.7000

Fax: (0xx88) 3677.7055

Home page: www.cnpc.embrapa.br

SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm>

Embrapa
Caprinos

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



10.80757