



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Imunologia Veterinária

Manual dos Trabalhos Práticos de Laboratório

Maria Cristina Queiroga

Título:

Imunologia Veterinária - Manual dos Trabalhos Práticos de Laboratório

Autor:

Maria Cristina Queiroga

ISBN: 978-972-778-382-3

Edição:

1ª Edição (Março 2024)

Índice

ÍNDICE	3
PROVAS IMUNOLÓGICAS.....	5
PROVAS QUE MEDEM UMA REAÇÃO SECUNDÁRIA À INTERAÇÃO AG-AC	5
<i>Provas de Aglutinação</i>	<i>7</i>
Prova de Rosa Bengala	7
Provas de identificação de bactérias	7
Questionário	8
<i>Provas de Precipitação.....</i>	<i>9</i>
Provas de imunodifusão dupla ou agar gel difusão (AGD) para detecção de Ac	9
Questionário	10
<i>Prova da Fixação do Complemento (FC).....</i>	<i>11</i>
Questionário	13
PROVAS QUE MEDEM A INTERAÇÃO PRIMÁRIA ENTRE O AG E O AC	15
<i>Provas de Imunofluorescência.....</i>	<i>15</i>
Imunofluorescência direta (IFD)	15
Imunofluorescência indireta (IFI).....	16
Questionário	17
<i>Provas de ELISA.....</i>	<i>18</i>
ELISA direto.....	18
ELISA indireto.....	19
ELISA de bloqueio ou de competição	20
Questionário	22

PROVAS IMUNOLÓGICAS

A especificidade de um antígeno (Ag) para o seu respetivo anticorpo (Ac) permite-nos utilizar os antígenos para detetar os anticorpos específicos e utilizar os anticorpos para pesquisar os antígenos correspondentes. Estes antígenos podem ser agentes etiológicos de doenças infecciosas ou simplesmente qualquer molécula que queiramos detetar ou quantificar. Já a pesquisa de anticorpos permite-nos detetar se o animal já esteve em contacto com o antígeno específico e, portanto, que está doente ou que está imunizado.

Estas provas que medem as reações entre antígeno e anticorpo são chamadas reações **serológicas**. É possível detetar um Ag se possuímos um soro específico com o correspondente Ac; e é possível detetar a presença de determinado Ac num soro se tivermos o Ag que lhe deu origem.

Entre as provas serológicas, algumas medem a interação primária entre o Ag e o Ac, outras detetam uma reação secundária que se estabelece como resultado dessa interação.

Provas que medem uma reação secundária à interação Ag-Ac

Como exemplo de provas que medem uma reação secundária à interação Ag-Ac, podemos referir as provas de Aglutinação, as provas de Precipitação e a prova da Fixação do Complemento.

A precipitação e a aglutinação são mecanismos de defesa, desenvolvidos no organismo do animal, pelas imunoglobulinas. É possível utilizar estes fenómenos como provas laboratoriais.

Como os Ac têm pelo menos dois locais de ligação ao Ag, e a maioria dos Ag têm pelo menos dois determinantes antigénicos, podem formar-se grandes agregados que são grandes complexos imunes (complexos Ag-Ac). Se esses complexos imunes se formam numa solução, com Ag solúveis, temos uma reação de precipitação, e os Ac responsáveis são chamados precipitinas. Quando os complexos imunes envolvem Ag particulados (células, bactérias ou outras partículas, como partículas de latex) trata-se de uma reação de aglutinação, e os Ac responsáveis são aglutininas. A reação de aglutinação envolvendo glóbulos vermelhos chama-se hemaglutinação, e os Ac responsáveis são hemaglutininas.

Os grandes complexos imunes que se produzem nestas provas são visíveis a olho nú.

Tanto as provas de precipitação como as provas de aglutinação podem ser qualitativas, permitindo apenas detectar a presença de Ag ou Ac, ou quantitativas, possibilitando a determinação da sua quantidade.

Para a prova da Fixação do complemento, utiliza-se complemento sérico para verificar de se formaram complexos imunes.

PROVAS DE AGLUTINAÇÃO

As provas de aglutinação podem ser para pesquisa de Ac, com é exemplo a Prova de Rosa Bengala que é uma prova de aglutinação rápida qualitativa para o diagnóstico de Brucelose, ou para pesquisa de Ag, como as provas de aglutinação para identificação de bactérias.

Prova de Rosa Bengala

Material:

- Placa de cerâmica
- Micropipeta e pontas
- Antigénio Rosa Bengala
- Soros de animais suspeitos
- Controlo positivo

Protocolo:

1. Deitar 20 µl de controlo positivo na primeira escavação da placa de porcelana.
2. Deitar 20 µl de cada soro suspeito nas respetivas escavações.
3. Deitar 20 µl do antigénio.
4. Misturar utilizando o palito.
5. Agitar durante 4 min.
6. Observar os resultados.

Provas de identificação de bactérias

Material:

- Cultura pura da bactéria a identificar
- Soro específico para identificação

Protocolo:

1. Deitar 1 gota do soro específico no cartão fornecido com o kit ou numa lâmina de microscópio.
2. Retirar uma pequena quantidade de cultura pura, em meio sólido não seletivo, e homogeneizar no soro.
3. Observar os resultados (se necessário à lupa esterioscópica).

Questionário

1. O que é a aglutinação? Explique o fenómeno da aglutinação.

2. Como tem que ser o Ag para uma prova de aglutinação?

3. Para que serve a prova de Rosa Bengala?

4. Como podemos identificar bactérias com provas de aglutinação?

PROVAS DE PRECIPITAÇÃO

As provas de precipitação também podem ser para pesquisa de Ac ou para pesquisa de Ag. Estas provas, como tanto o Ag como o Ac são solúveis, podem ser feitas e meio líquido. Porém é mais prático fazê-las em agarose. Nesta agarose, os Ag e os Ac difundem-se na fase líquida e quando se encontram em quantidades equivalentes, formam-se os grandes complexos imunes que se tornam visíveis como linhas de precipitação. Estas provas e chamam-se provas de imunodifusão.

Provas de imunodifusão dupla ou agar gel difusão (AGD) para detecção de Ac

Material:

- Placas de gelose
- Furador e molde
- Antigénio
- Soros de animais suspeitos

Protocolo:

1. Fazer escavações nas placas usando o molde.
2. Colocar 15 µl do antigénio na escavação central.
3. Colocar o controlo positivo numa das escavações adjacentes.
4. Distribuir os soros a testar (15 µl) nas outras escavações à volta.
5. Incubar 18-48 h em atmosfera húmida a 25°C.
6. Observar a placa. Verificar a formação de uma linha de precipitação correspondente à reação do controlo positivo. Ver quais os soros positivos e negativos.

Questionário

1. O que é a precipitação? Explique o fenómeno da precipitação.
2. Como tem que ser o Ag para uma prova de precipitação?
3. Que vantagens tem a prova de imunodifusão radial sobre a prova de imunodifusão dupla.
4. Como tem que ser a agarose para uma prova de imunodifusão radial para pesquisa de Ac?

PROVA DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO (FC)

Material:

- Microplacas de 96 poços com fundo redondo (em U)
- Tampão veronal
- Soro positivo – controlo positivo
- Soro negativo – controlo negativo
- Antigénio
- Complemento (soro de cobaio titulado)
- Complexo hemolítico (mistura de glóbulos vermelhos de ovino (SRBC – sheep red blood cells) + anticorpo anti-SRBC)
- Soros a testar

OIE International Standard Serum (OIEISS) – soro de bovino que contém 1000 ICFTU (*international complement fixation test units*).

Protocolo:

1. Inativação dos soros a testar a 56°C durante 30 min.
2. Deitar 25 µL de tampão em todos os poços da placa.
3. Deitar 25 µL de soro controlo negativo no poço A1.
4. Deitar 25 µL de soro controlo positivo no poço B1.
5. Deitar 25 µL de cada soro a testar nos poços da coluna 1 (de C a H). Nestes poços os soros ficam diluídos a 1:2.
(No *screening*, deitar 1 soro em cada poço de toda a placa – 96 soros – e passar para o ponto 7 do protocolo.)
6. Fazer diluições seriadas ao dobro a partir da diluição 1:2 (1:4, 1:8 e 1:16, etc), passando 25 µL de cada diluição para o poço seguinte. Descartar 25 µL do poço última diluição pretendida.
7. Adicionar 25 µL de antigénio em todas as diluições exceto na diluição a 1:2 (portanto não deitar na coluna 1).
8. Deitar 25 µL de tampão nos poços da coluna 1 (para ficarem com a mesma quantidade dos outros).
9. Adicionar 25 µL de complemento em todos os poços.
10. Preparar poços com os seguintes controlos
25 µl antigénio + 25 µl complemento + 25 µl de tampão – Testemunha de Ag
25 µl de complemento + 50 µl de tampão – Testemunha de Complemento
75 µl de tampão – Testemunha de Complexo hemolítico
11. Incubar as placas a 37°C durante 30 min ou a 4°C durante a noite.

12. Adicionar 25 ou 50 µl de complexo hemolítico.
13. Incubar as placas a 37°C durante 30 min.
14. Centrifugar as placas a 1000 g, a 4°C, durante 10 min ou deixar sedimentar a 4°C durante 2 a 3 horas.
15. Ver se algum soro é anticomplementar na diluição de 1:2.
16. Ler o resultado de acordo com o grau de hemólise: negativo 100% de hemólise, + 75% de hemólise, ++ 50% de hemólise, +++ 25% de hemólise, ++++ 0% de hemólise.
17. Consultar a tabela para ver o título dos soros em ICFTU (international complement fixation test units) por mL.
18. Soros com um título igual ou superior a 20 ICFTU/mL são considerados positivos. (Fêmeas vacinadas com B. abortus S19 entre os 3 e os 6 meses são consideradas positivas se o título for igual ou superior a 30 ICFTU/mL quando os animais são testados com 18 meses ou mais).

Questionário

1. Porque temos que Inativar dos soros a testar a 56°C durante 30 min?
2. O que é um soro anticomplementar? Que razões podem tornar o soro anticomplementar?
3. Como verificamos se o soro é anticomplementar?
4. Qual é a via de ativação que desencadeia a cascata do complemento nesta prova? E qual é a ação do complemento que provoca a reação da prova?

Provas que medem a interação primária entre o Ag e o Ac

Para as provas que medem a interação primária entre o Ag e o Ac, utilizamos Ag ou Ac marcados com substâncias que nos permitem visualizar se o complexo imune se formou. É possível conjugar os Ac com corantes, fluorescentes ou não, ou com enzimas, sem que aqueles percam a capacidade de se ligar aos Ag.

Como exemplo de provas que medem a interação primária entre o Ag e o Ac, podemos referir as provas de Imunofluorescência, as provas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e as prova de Imunocromatografia.

PROVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Material:

- Lâminas de microscópio e lamelas
- Tampão PBS
- Acetona a -20°C
- Amostra clínica (ou soro se for para imunofluorescência indireta-IFI)
- Conjugado – anti-antigénio para imunofluorescência direta-IFD, ou anti-espécie para IFI
- Antigénio – para IFI
- Solução tamponada de glicerol pH 9,2

Protocolo

Imunofluorescência direta (IFD)

1. Colocar a amostra numa lâmina.
2. Preparar o controlo positivo.
3. Para o controlo negativo fazer uma lâmina com PBS.
4. Deixar secar na estufa a 37°C.
5. Fixar com acetona a -20°C, durante 30 minutos.
6. Adicionar o conjugado fluorescente na diluição apropriada.
7. Incubar durante 30 minutos, a 37°C, em câmara húmida.
8. Lavar as lâminas três vezes com solução PBS, durante 10 minutos, e uma vez com água corrente, sem incidir diretamente sobre o material fixado.
9. Montar as lâminas com solução de glicerol.
10. Examinar as lâminas com microscópio de fluorescência, para identificação das formas microbianas fluorescentes.

Imunofluorescência indireta (IFI)

1. Preparar as lâminas com o antigénio (cultura pura).
2. Deixar secar na estufa a 37°C.
3. Fixar com acetona a -20°C, durante 30 minutos.
4. Cobrir com o soro a testar.
5. Preparar o controlo positivo com um soro positivo.
6. Preparar o controlo negativo com um soro negativo.
7. Incubar durante 30 minutos, a 37°C, em câmara húmida.
8. Lavar as lâminas três vezes com solução PBS, durante 10 minutos, sem incidir diretamente sobre o material fixado
9. Adicionar o conjugado fluorescente na diluição apropriada (soro anti-espécie).
10. Incubar durante 30 minutos, a 37°C, em câmara húmida.
11. Lavar as lâminas três vezes com solução PBS, durante 10 minutos, e uma vez com água corrente, sem incidir diretamente sobre o material fixado.
12. Montar as lâminas com solução tamponada de glicerol pH 9,2.
13. Examinar as lâminas com microscópio de fluorescência, para identificação das formas microbianas fluorescentes.

Questionário

1. Qual o método de IF para detecção de Ag? E de Ac?

2. Em que suporte são preparadas as amostras para a prova de imunofluorescência?

3. O que é um soro anti-espécie?

4. Qual é a particularidade do microscópio de fluorescência?

PROVAS DE ELISA

Material:

- Microplacas de 96 poços com fundo reto (em \square)
- Anticorpo de captura para recobrir (*coating*) das placas (para ELISA direto) ou Antígeno (para ELISA indireto e ELISA de bloqueio).
- Tampão de lavagem
- Tampão de saturação
- Tampão de diluição
- Soro positivo – controlo positivo
- Soro negativo – controlo negativo
- Soros a testar
- Ac anti-Ag em análise conjugado com peroxidase ou Ac anti-espécie conjugado com peroxidase
- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)
- H₂SO₄ 3M
- Leitor de placas com filtro de 450nm.

Protocolo

ELISA direto

(pesquisa de IgG)

1. Coating da placa de ELISA (fixação dos anticorpos de captura):
Depositar os anticorpos anti-pig IgG affinity – 100 μ l/ponto;
Incubar a placa coberta com um filme autocolante uma noite a 4°C.
2. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes com 200 μ l/ponto de tampão de lavagem.
3. Saturação da placa ELISA:
Depositar 200 μ l/ponto de tampão de saturação;
Incubar a placa durante 2 horas à temperatura ambiente.
4. Esvaziar placa.
Lavar 3 vezes a placa com 200 μ l/ponto de tampão de lavagem.
5. Tampão de diluição
Depositar 50 μ l/ponto de tampão de diluição em todos os pontos das linhas A a H.
6. Distribuição das amostras
Transferir 50 μ l de cada amostra nos pontos 1 das linhas C a H
7. Distribuição dos controlos
Distribuir 50 μ l de Controlo positivo no ponto 1A.
Distribuir 50 μ l de Controlo negativo no ponto 1B.

8. Os últimos pontos (ponto 12) de todas as linhas são para brancos levando apenas tampão de diluição. Estes pontos vão levar todos os reagentes excluindo as amostras.
9. Diluir todos os soros, transferindo 50 µl do ponto 1 para o ponto 2 e sucessivamente até ao ponto 11. Retirar 50 µl do ponto 11 e descartar.
10. Incubar a placa coberta 2 horas à temperatura ambiente.
11. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
12. Colocação do tampão com o anticorpo conjugado (com peroxidase) – Ac anti-IgG.
Colocar 100µL por ponto (em toda a placa) e deixar a placa coberta;
Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.
13. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
14. Revelação da placa:
Colocar 100µL por ponto de substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine); (em toda a placa)
Incubar durante cerca de 30 minutos.
15. Paragem da reacção:
Colocar 100µL por ponto de H₂SO₄ 3M por ponto (em toda a placa).
16. 11 – Leitura da placa a 450nm.

ELISA indireto

(pesquisa de Ac anti Brucella)

1. Coating da placa de ELISA com Ag:
Depositar 50 µl/ponto de Agdiluído em PBScom 20 µg/mL.
Incubar a placa coberta com um filme autocolante uma noite a 4°C.
2. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
3. Saturação da placa ELISA:
Depositar 200µl/ponto de tampão de saturação;
Incubar a placa durante 2 horas à temperatura ambiente.
4. Esvaziar placa.
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
5. Tampão de diluição
Depositar 50µl/ponto de tampão de diluição em todos os pontos das linhas A a H.

6. Distribuição das amostras
Transferir 50 µl de cada amostra nos pontos 1 das linhas C a H
7. Distribuição dos controlos
Distribuir 50 µl de Controlo positivo no ponto 1A.
Distribuir 50 µl de Controlo negativo no ponto 1B.
17. Os últimos pontos (ponto 12) de todas as linhas são para brancos levando apenas tampão de diluição. Estes pontos vão levar todos os reagentes excluindo as amostras.
8. Diluir todos os soros, transferindo 50 µl do ponto 1 para o ponto 2 e sucessivamente até ao ponto 11. Retirar 50 µl do ponto 11 e descartar.
9. Incubação:
Incubar a placa coberta 2 horas à temperatura ambiente.
10. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
11. Colocação do tampão com o anticorpo conjugado (com peroxidase) – Ac anti-espécie.
Colocar 100µL por ponto (em toda a placa) e deixar a placa coberta;
Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.
12. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
13. Revelação da placa:
Colocar 100µL por ponto de substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine); (em toda a placa)
Incubar durante cerca de 30 minutos.
14. Paragem da reacção:
Colocar 100µL por ponto de H₂SO₄ 3M por ponto (em toda a placa).
15. 11 – Leitura da placa a 450nm.

ELISA de bloqueio ou de competição

(pesquisa de Ac anti Leucose bovina)

1. Coating da placa de ELISA com Ag
Depositar 50 µl/ponto de Agdiluído em PBScom 20 µg/mL.
Incubar a placa coberta com um filme autocolante uma noite a 4°C.
2. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
3. Saturação da placa ELISA:

- Depositar 200µl/ponto de tampão de saturação;
Incubar a placa durante 2 horas à temperatura ambiente.
4. Esvaziar placa.
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
 5. Tampão de diluição
Depositar 50µl/ponto de tampão de diluição em todos os pontos das linhas A a H.
 6. Distribuição das amostras
Transferir 50 µl de cada amostra nos pontos 1 das linhas C a H
 7. Distribuição dos controlos
Distribuir 50 µl de Controlo positivo no ponto 1A.
Distribuir 50 µl de Controlo negativo no ponto 1B.
 18. Os últimos pontos (ponto 12) de todas as linhas são para brancos levando apenas tampão de diluição. Estes pontos vão levar todos os reagentes excluindo as amostras.
 8. Diluir todos os soros, transferindo 50 µl do ponto 1 para o ponto 2 e sucessivamente até ao ponto 11. Retirar 50 µl do ponto 11 e descartar.

(se for ELISA de competição, saltar para o ponto 12)

9. Incubação:
Incubar a placa coberta 2 horas à temperatura ambiente.
10. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
11. Colocação do tampão com o anticorpo conjugado (com peroxidase) – Ac anti-vírus da leucose.
Colocar 100µL por ponto (em toda a placa) e deixar a placa coberta;
Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.
12. Esvaziar placa;
Lavar 3 vezes a placa com 200µl/ponto de tampão de lavagem.
13. Revelação da placa:
Colocar 100µL por ponto de substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine); (em toda a placa)
Incubar durante cerca de 30 minutos.
14. Paragem da reacção:
Colocar 100µL por ponto de H₂SO₄ 3M por ponto (em toda a placa).
15. – Leitura da placa a 450nm.

Questionário

1. Qual o Ac usado conjugado com peroxidase no ELISA direto?
2. Qual o Ac usado conjugado com peroxidase no ELISA indireto?
3. Qual o Ac usado conjugado com peroxidase no ELISA de bloqueio?
4. No ELISA de bloqueio um soro positivo desenvolve mais ou menos coloração que um soro negativo?