

38. Imunodifusão em gel de ágar para leucose bovina

1. Utilizar placas de Petri de plástico. Adicionar 15mL de ágar 0,8% em cada placa.
2. Após o gel solidificar fazer uma marca com caneta na borda externa da placa para marcar a primeira roseta. Perfurar 7 rosetas no gel com auxílio do perfurador, cuidando para que as rosetas fiquem alinhadas com a marca da caneta.
3. As rosetas são identificadas por número (1 até 7) no sentido horário, a roseta de número 7 está localizada no centro da placa. Cada placa tem espaço para 7 rosetas, e em cada roseta podem ser testadas 4 amostras, ou seja, em uma placa são testadas 28 amostras.
4. Retirar o gel do centro dos orifícios com a bomba de vácuo.
5. Preencher a ficha de identificação das amostras, rosetas e placas.
6. Colocar o antígeno (30µL) no orifício central de cada roseta, o soro controle nos orifícios superior e inferior de cada roseta e os soros testes nos orifícios laterais.
7. Os orifícios de uma roseta são identificados de acordo com o seu posicionamento. Os orifícios laterais são identificados de 1 até 4, no sentido horário e de acordo com a roseta 1 até o controle +.

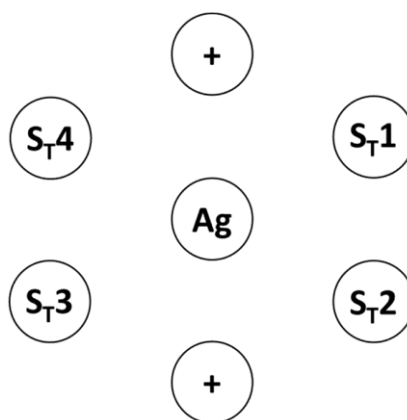


Figura 3: Representação esquemática da roseta para IDGA.

Ag:Antígeno.

S_T: Soro- teste.

+: Soro controle positivo para BLV.

8. Incubar a placa em uma caixa de isopor com um algodão umedecido em água por 72 horas em temperatura ambiente.
9. Realizar a primeira leitura com 48 horas e a leitura final às 72 horas de incubação.

Reagentes e Soluções:

1. Tampão de IDGA (pH 7,2 – 7,4):

*Conservar à temperatura ambiente.

Reagente	Concentração final (mmol)	Quantidades (gramas)
NaCl	1,45M	85g
KCl	0,003M	0,2g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	0,008M	1,2g
KH ₂ PO ₄	0,0015M	0,2g
EDTA Dissódico	0,001M	0,372g
Azida Sódica	0,01g/100mL	0,1g
Água Destilada qsp		1 litro

2. Gel de Ágar a 0,8%:

Aquecer por fervura ou no forno de microondas até dissolver o gel completamente. Não deixar ferver por muito tempo, pois o tampão irá evaporar e o gel ficará mais concentrado do que o desejado.

Reagentes	Quantidades
Ágar Noble ou Agarose	0,8g
Tampão de IDGA	100mL

OBS.:

- Sempre utilizar ágar fresco, nunca armazene o ágar pronto;
- Sempre mensurar o pH da solução tampão antes de fazer as placas.
- Placas prontas anteriormente têm validade de 48 horas armazenadas em geladeira;

*Fonte do antígeno: TECPAR® Laboratórios, Paraná.

39. Imunodifusão em gel de ágar para língua azul

1. Utilizar lâminas de vidro limpas e desengorduradas com álcool.
2. Adicionar 5ml de ágar 0,85% em cada lâmina, com o auxílio de uma pipeta.
3. Deixar o ágar solidificar por 20min para então perfurar duas rosetas no gel.
4. Retirar o gel do centro dos orifícios com a bomba de vácuo.
5. Preencher a ficha de identificação das amostras, rosetas e placas
6. Colocar 30 µL do antígeno no orifício central de cada roseta, o soro controle nos orifícios superior e inferior de cada roseta e os soros testes nos orifícios laterais.
7. Os orifícios de uma roseta são identificados de acordo com o seu posicionamento. Os orifícios laterais são identificados de 1 até 4, no sentido horário e de acordo com a roseta 1 até o controle +.

Reagentes e Soluções:

1. Gel de ágar

Reagentes	Quantidades
Agarose	0,85g
Solução de NaCl 0,9%	100mL

2. Antígeno e soro controle

Obtido a partir da amplificação de BTV em células BHK-21 e concentrado. Fonte: Laboratório de Virologia Animal, Dra Zélia Lobato (UFMG).