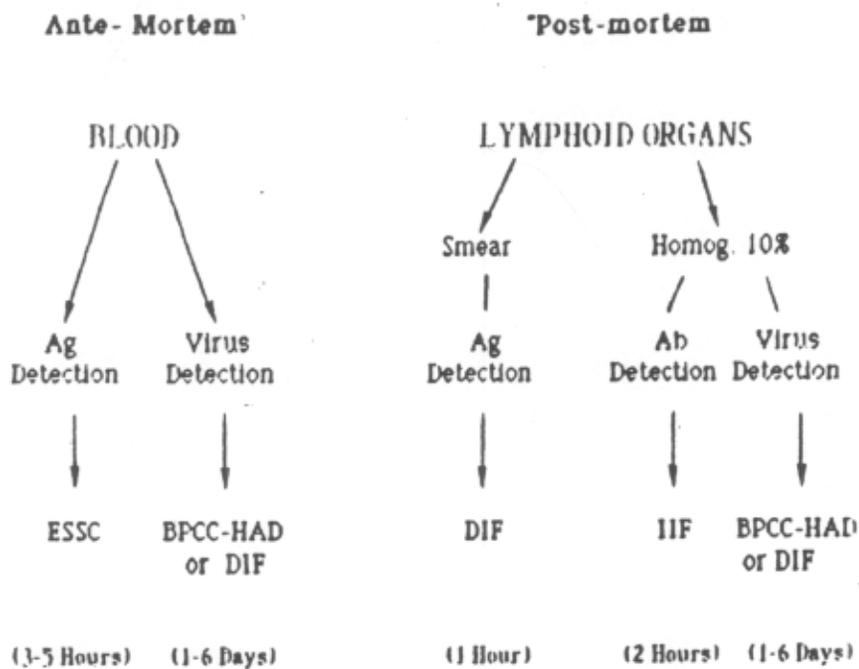


LABORATORY DIAGNOSIS OF ASF

ACTIVE DISEASE

POSSIBILITIES

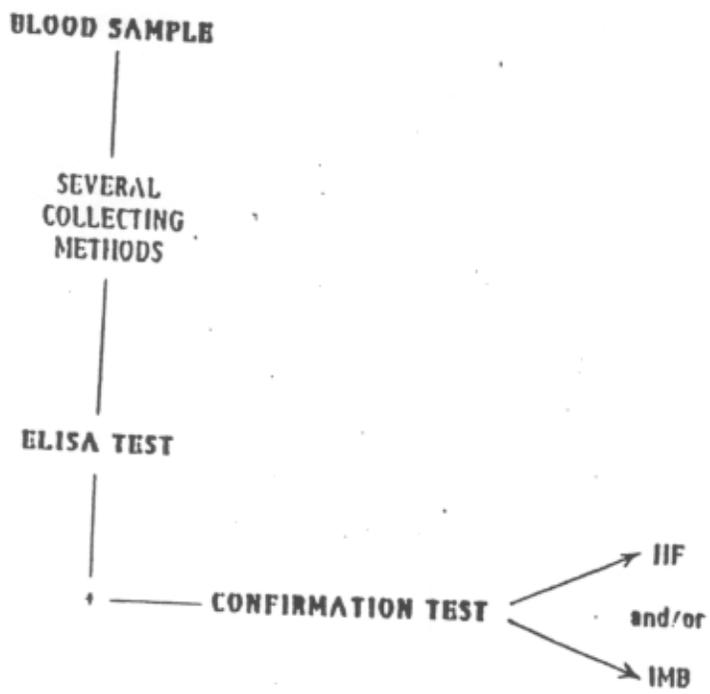


ESSC - ELISA sandwich and simultaneous confirmation test
DIF - Direct Immunofluorescence test
IIF - Indirect Immunofluorescence test

BPCC - Blood pig cell cultures
HAD - Hemadsorption test
Ag - Antigen
Ab - Antibody

RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF ASF

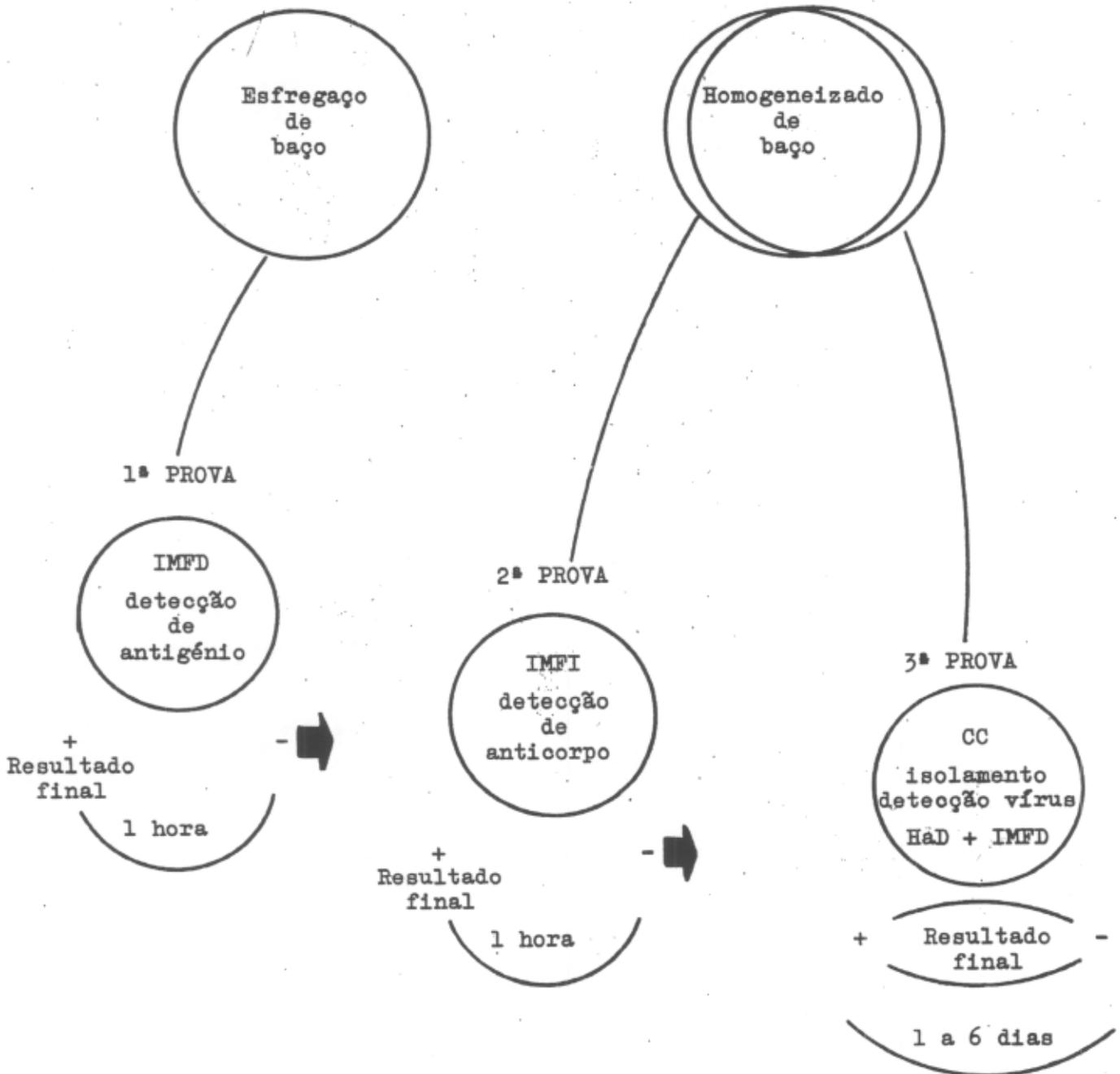
ANTIBODY DETECTION



IIF - Indirect Immunofluorescence

IMB - Immunoblot (Westernblot)

DIAGNOSTICO VIROLOGICO DA PESTE SUINA AFRICANA



IMFD = Imunofluorescência Directa
 IMFI = Imunofluorescência Indirecta
 CC = Culturas Celulares
 HaD = Hemoadsorção

PROCEDIMENTO PARA O DIAGNOSTICO VIROLOGICO DE ROTINA
DA PESTE SUINA AFRICANA

- 1ª PROVA
1. Identificação de antigénio viral, pela prova de imunofluorescência directa (IFD) em esfregaço de órgãos de animais vitimados (baço, pulmão, ganglio etc.).
- 2ª PROVA
2. Identificação de anticorpos, a partir de extracto de órgãos (baço, pulmão, ganglio etc.) ou soro sanguíneo, pela prova de imunofluorescência indirecta (IFI).
- 3ª PROVA
3. Identificação de vírus, a partir de órgãos de animais vitimados (baço, pulmão, ganglio etc.), em culturas de leucocitos de suino, pelas provas de hemoadsorção (HAD) ou IFD.

O resultado positivo em cada prova desta sequência é considerado resultado FINAL.

O resultado negativo implica a passagem à prova seguinte.

Eventualmente pode recorrer-se a outras provas, que ainda de grande valor, são de menor eficiência no diagnóstico de rotina.

São as provas de:

- a. Inoculação ao porco e microscopia electrónica para a identificação de vírus.
- b. Electrosmoforese e fixação do complemento para detecção de anticorpos.

1ª Prova do Diagnóstico Viroológico

Imunofluorescência Directa

- a. Preparação do órgão (corte da parte interior de baço em forma de de cubo com 1 cm de aresta) e esfregação em lamela quadrada de 16 mm. Colocar em pequeno frasco com células para cima e secar a 37 durante 15 a 30 minutos.
- b. Fixar em acetona (conservada no congelador a -20 C) no mesmo frasco durante 10 minutos.
- c. Eliminar a acetona e secar a temperatura ambiente.
- d. A lamela é colocada em atmosfera húmida e coberta com soro anti-PSA conjugado FITC durante 45 minutos.
- e. Lavagem 3 x em soluto salino a 0,9% e 3 x em água destilada.
- f. Montagem em lamina com glicerina-tampão (9:1) e observação em microscopia de fluorescência.

No modelo de positividade tem particular interesse, para além da fluorescência citoplasmica, a observação de intensa fluorescência ao nível de inclusão citoplasmatica (que corresponde à fabrica de vírus).

2ª Prova do Diagnóstico Virologico

Imunofluorescência Indirecta

- a. Lamela com células CV₁ infectadas com vírus PSA (ver preparação pag. 4) é coberta com homogeneizado de órgão (ver preparação pag. 3) para identificação de anticorpo PSA, e deixada em atmosfera húmida a 37 C durante 45 minutos.
- b. Lavagem 3 x com soluto salino 0,9% e 3 x em água destilada.
- c. Secagem com secador eléctrico.
- d. Cobrir a lamela com soro anti-suino conjugado FITC e colocar de novo em atmosfera húmida a 37 C durante 45 minutos.
- e. Lavagem 3 x em soluto salino 0,9% e 3 x em água destilada.
- f. Montagem em lamina com glicerina-tampão (9:1) e observação em microscopia de fluorescência.

O modelo de positividade é dado predominantemente pela observação de intensa fluorescência ao nível de inclusão citoplasmica, que corresponde às fabricas de vírus.

Contudo, é possível também, ainda que com menor frequência, o modelo de fluorescência correspondente à membrana citoplasmica. Nestes casos a diluição do material-amostra torna possível a observação da inclusão fluorescentes.

3ª Prova de Diagnostico Virologico

Identificação ou isolamento do vírus da PSA em cultura de leucócitos de suíno.

a. Inoculação de cultura de leucócitos em tubos (preparação nas pagas 1 e 2 - 2 tubos por amostra) com 0,2 ml do homogeneizado de órgão (preparação pag. 3).

b. A partir do dia seguinte, os tubos de cultura são observados ao microscópio para detecção de formas de hemoadsorção, com os globulos vermelhos residuais das culturas celulares.

Se os globulos vermelhos residuais são insuficientes, adiciona-se uma suspensão de globulos vermelhos de suíno lavados, para uma concentração de 0,5% (0,2 ml de uma suspensão a 5% em meio EAGLE, por cada tubo).

c. A detecção de formas de hemoadsorção (globulos vermelhos em roseta em volta de celulas infectadas) são indicativo de multiplicação viral, e assim, as amostras correspondentes são consideradas positivas à PSA. Pode fazer-se 1 ou 2 observações diárias das culturas.

d. Se ao fim de 6 dias não são observadas formas de hemoadsorção, o total de celulas de cada amostra (já suspensas ou descoladas com rubber) são centrifugadas, e do sedimento faz-se esfregaço sobre lamela. Procede-se agora como para a 1ª Prova, isto é, imunofluorescência directa (ver pag 5).

Da observação em microscopia de fluorescência é dado o resultado final.

Na practca nós usamos só a prova final de imunofluorescência directa.

Preparação de homogeneizado de órgãos

- a. A partir, usualmente de baço, faz-se uma suspensão a 20% em solução salino Hank's, em almofariz ou qualquer homogeneizador.
- b. Centrifugar 30 minutos a 3000 rpm.
- c. O sobrenadante é recolhido, adiciona-se antibióticos (penicilina, estreptomicina ou só neomicina) e deixa-se ficar à temperatura ambiente cerca de 1 hora.

A dose normal de antibioticos (100 UI de penicilina, 0,1 mg de estreptomicina ou 100 μ g de neomicina por ml.) pode ser reforçada 3 a 4 vezes, uma vez que quando se inocula este material a culturas celulares, fica diluído (1/10) no meio de cultura.

A partir deste homogeneizado são conduzidas as provas de identificação de anticorpos (2ª Prova) e vírus (3ª Prova).

Preparação de Antígeno para Prova de Imunofluorescência Indirecta

- a. Cultura de células CV₁ sobre lamela em tubos de Leighton, a partir de subcultura de garrafa de Roux.
- b. 24 horas depois, normalmente uma monocamada está formada, e as células são infectadas com vírus PSA adaptado a este sistema celular, a uma multiplicidade de 0,1 a 1.
- c. 14-16 horas depois da infecção, as culturas de cada lamela são lavadas com solução salina e em seguida secas a 37 C durante 30 minutos.
É aconselhável fazer uma prova de imunofluorescência directa, nesta fase, para avaliar o grau de infecção, antes de prosseguir nos restantes passos.
- d. Fixação em acetona previamente arrefecida (-20) durante 10 minutos.
- e. Secagem a temperatura ambiente.
- f. As lamelas são armazenadas a -20 C em pequenos frascos, hermeticamente fechados, com o fundo coberto de sílica-gel para se manterem bem secas.

Quando necessário a sua utilização, o frasco deve ser mantido entre as mãos do operador 1 ou 2 minutos e mais 10 minutos a temperatura ambiente antes de abrir. Evita-se assim a humedificação imediata da lamela.

Um processo alternativo de preparação de antígeno é a utilização de células CV₁ infectadas em garrafas, descoladas por tripsinização ou pelo efeito citopatogénico, para fazer esfregaços sobre lamela, seguidos dos mesmos passos do processo anterior.

CULTURA DE LEUCOCITOS DE PORCO

Em uso no nosso laboratório

De sangue heparinizado:

1. Sangue obtido da veia cava anterior, com seringa com heparina (4 mg/10 ml ou 50 U/ml) ou para frasco com heparina na quantidade conveniente para o sangue a obter.
Usualmente 50 a 100 ml de sangue.
2. Passar por gaze e juntar 7 ml de Dextran a 6% em SF/50 ml sangue (facilita a deposição de globulos vermelhos).
3. Distribuir em pequeno frasco Erlenmayer ou tubo de centrifuga (\pm 40 ml) e incubar a 37 durante 30 a 60 minutos.
4. Retirar o sobrenadante que contém os leucocitos (soro com fibrina e alguns globulos vermelhos) e lavar 2 vezes com EAGLE, a 1000 rp
5. Resuspender o sedimento em novo meio de cultura (meio de EAGLE com soro do suino dador de celulas, a 20%). Usualmente uma boa concentração de celulas é obtida com o volume de meio de cultura igual ao volume inicial de sangue.
6. Distribuir em tubos de cultura com 2 ml e incubar a 37.
7. A transformação para grandes celulas granulares do tipo macrofago ocorre 48 a 72 horas após a incubação, quando devem ser inoculado com o material suspeito.

Devem ser feitos 2 lotes de cultura na semana (2ª e 6ª) para cobrir toda a semana com culturas de 2 a 4 dias, tempo considerado de maior sensibilidade para o vírus da PSA.

ATENÇÃO

Factor importante de viabilidade de cultura é o uso de soro do dador de celulas, que também evita a possibilidade de reacção de aglutinação.