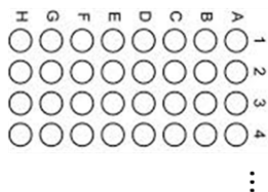
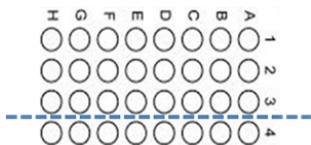


Este kit está preparado para 4 ensaios ELISA

- **Guardar reagentes no frigorífico (4°C):** antigénio, soro dos animais
- **A placa deve ser orientada** do seguinte modo:



- **O filme adesivo** fornecido pode ser utilizado caso se queiram realizar os 4 ensaios em tempos diferentes. Para realizar um ensaio e manter intactos os outros poços, cortar com bisturi ao final 3 linhas e destacar filme adesivo:



Durante os passos de incubação tapar os poços com a tampa.

- **Preparação do substrato:** adicionar 1,5mL de Bicarbonato de Sódio ao microtubo de 2mL que contém o substrato em pó, utilizando a pipeta de Pasteur de plástico fornecida no kit. Fechar o microtubo e agitar. Utilizar a mesma pipeta de Pasteur de plástico para colocar 3 gotas de substrato em cada poço.

- **Ler os resultados** ao fim de 1h de incubação. Se decorrer muito mais tempo os resultados podem sofrer alterações e as diferenças podem tornar-se menos evidentes.

Preparado em: ____/____/____
(Validade 11 meses)

Em caso de esclarecimentos adicionais contactar:

Ana Elisabete Pires:
ana.elisabete.pires@gmail.com

Carla Borges: carla.borges@iniav.pt

CASO ESTUDO

Neste ensaio prático pretende-se avaliar a imunocompetência de cachorros que foram vacinados com uma ou duas tomas de uma vacina contra o vírus da esgana. Pretende-se avaliar qual dos cachorros se encontra mais protegido contra o vírus da esgana, ou seja, qual deles apresenta um nível ou título de anticorpos superior.



PROTOCOLO

- 1** - Deposição de 2 gotas (~80uL com conta gotas) de **Antigénio (A)** nos poços de acordo com o esquema que se segue (ver Notas para orientação da placa) e incubação durante 60 minutos a 37°C.

A		A		A		A	
A		A		A			
A		A		A			A

Após incubação verter a placa no lavatório com energia e lavar 1X com água destilada utilizando o esguicho. Virar a placa sobre papel absorvente para limpar qualquer gota de água.

- 2** - Deposição de 2 gotas de **amostra de soro sanguíneo** a analisar em cada poço de acordo com o esquema que se segue. Testar cada animal em triplicado.

A1		A2		A3		C-	
A1		A2		A3			
A1		A2		A3			C+

Posterior incubação durante 20 minutos a 37°C.

Após incubação verter a placa no lavatório com energia e lavar 1X com água destilada utilizando o esguicho. Virar a placa sobre papel absorvente para limpar qualquer gota de água.

- 3** - Deposição de 2 gotas do **Anticorpo conjugado** em cada um dos poços utilizados e posterior incubação durante 2 minutos a 37°C.

Após incubação verter a placa no lavatório com energia e lavar 1X com água destilada utilizando o esguicho. Virar a placa sobre papel absorvente para limpar qualquer gota de água.

Preparar o substrato de fresco! Adicionar 1,5mL de bicarbonato de sódio a 1,5mg de 4-nitrofenilfosfato. (**ver Notas**)

- 4** - Deposição de 3 gotas de **Substrato** e incubação durante 60 minutos a 37°C.

- 5** - Registrar e interpretar resultados.

NOTAS

- O fundo de cada poço é coberto com uma fração proteica do vírus da esgana (antigénio) e fixa-se ao fundo de cada poço da placa ELISA.
- Depois segue-se um passo de incubação com o soro dos animais (que tem menos ou mais anticorpo contra a esgana desenvolvidos após vacinação ou mesmo nenhum anticorpo se o cachorro não tiver sido ainda vacinado). Se o anticorpo estiver presente no soro dos animais este liga-se ao antigénio especificamente e as duas proteínas (antigénio e anticorpo) ficam ligadas por ligações fracas tipo não covalentes (ex.interações electrostáticas, ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas).

- Depois segue-se um passo de incubação com um anticorpo secundário que reconhece o anticorpo contra a esgana caso ele esteja presente. Este anticorpo secundário também se denomina de conjugado pois tem associado a si uma enzima importante para o passo seguinte
- Incubação com o substrato: neste passo se todas as ligações tiverem sido correctamente estabelecidas então a enzima é capaz de clivar o substrato e neste caso aparece uma cor amarela no final da incubação. Caso não se tenham estabelecido as ligações, ou seja, se o anticorpo não estiver no soro as ligações não se estabelecem e os componentes são removidos nos vários passos de lavagem previstos no protocolo.
- O aparecimento de cor amarela no final do ensaio e a sua intensidade são directamente proporcionais à presença e quantidade do anticorpo no soro. É um método semi-quantitativo.
- É importante controlar o processo com os poços dos controlos positivo e negativo. Só depois de estes estarem validados (poço de controlo negativo sem cor amarela e poço de controlo positivo com cor amarela) é que se devem ler os resultados de cada amostra e concluir sobre o estado de imunocompetência dos animais em teste.