
Peripneumonia Contagiosa dos Bovinos
Doc.Ref.: PE – 006 – PSA/BM

Teste Fixação do Complemento (CFT)

Princípio do método

A prova de fixação do complemento (FC) é utilizada como prova de rastreio; todas as amostras de soro positivas ou duvidosas a esta prova devem ser submetidas a um teste complementar para confirmação da infeção. Esta prova baseia-se na deteção e quantificação de anticorpos fixadores do complemento anti-*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm).

A prova de FC consiste em duas fases - Fixação e Hemólise. Na 1ª fase (Fixação), o antigénio (Ag) Mmm e a amostra de soro a testar (ST) são misturados com soro de cobaio que contem complemento (C). Se o ST contiver anticorpos específicos (Ac) anti-Mmm forma-se um complexo Ag-Ac e o complemento é ativado e fixado, não ficando disponível para reagir na 2ª fase.

Na 2ª fase (Hemólise), é adicionado o sistema hemolítico (SH). Quando o ST possui anticorpos específicos do Ag, os GV não são lisados pelo complemento pois este foi fixado na 1ª fase da prova e a reação é positiva. Quando o ST não possui Ac específicos, não há formação do complexo Ag-Ac na 1ª fase da prova, o C não é ativado e permanece livre para lisar os GV do sistema hemolítico, sendo a reação negativa. O grau de hemólise, consequência da lise globular, é a base para a interpretação e quantificação dos resultados.

Nos bovinos o principal anticorpo fixador do complemento é a IgG1; a IgG2 não fixa o complemento de cobaio e tem a capacidade de impedir a fixação do complemento por outras imunoglobulinas produzindo assim um fenómeno de prozona. Ocorre quando a quantidade de anticorpos presente na amostra de soro é desproporcional em relação à quantidade de antigénio do teste (i.e. soros altamente positivos) gerando resultados falso-negativos O problema é facilmente solucionado testando-se a amostra em diluições mais altas.

1. Reagentes:

- 1.1. Água bidestilada esterilizada ou ultrapura;
- 1.2. Tampão Veronal (TV) – Tampão disponível no mercado especializado.
- 1.3. Soros a testar (ST).
- 1.4. Antigénio *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm). É utilizado na prova a 2 UA (DT 1/40).
- 1.5. Complemento - soro de cobaio liofilizado disponível no mercado especializado. É utilizado em prova a 2,5 UHC.
- 1.6. Glóbulos vermelhos de carneiro (GV);
- 1.7. Hemolisina - soro hiperimune de coelho, anti-glóbulos vermelhos de carneiro, disponível no mercado especializado. É utilizada em prova a 12 UHH.
- 1.8. NRS – Soro negativo de bovino, disponível no Laboratório de Referência da OIE para PPCB (Portugal). Soro isento de anticorpos anti-*Mycoplasma*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Leptospira*, *Mycobacterium paratuberculosis* e leucose bovina.
- 1.9. PRS – Soro positivo de bovino, com título 4+/160 e 2+/320, disponível no Laboratório de Referência da OIE para PPCB (Portugal).

2. Procedimento (micrométodo):

Os ST devem apresentar-se isentos de contaminação. Caso haja turvação causada por suspensão de glóbulos vermelhos, centrifugar a 1500 g, durante 10 minutos. Os ST são postos em prova na diluição de 1/10 em TV (ex: 100µl de soro + 900µl de TV) e inativados em banho de água a 56°C ± 2°C durante 30 minutos, no dia em que são testados.

2.1. Preparação do SH:

- 2.1.1. Após titulação, diluir a hemolisina de modo a obter 12 UHH. Assim, por exemplo, se 1UHH estiver contida na diluição 1/12000 deve utilizar-se a hemolisina a 1/1000 (ex.: $12.000 / 12 = 1000$);
- 2.1.2. Juntar volumes iguais de GV a 6% e hemolisina a 12 UHH (ex.: 2 ml de GV a 6% + 2 ml de hemolisina a 12 UHH) e sensibilizar o SH incubando em banho de água a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos.

2.2. Execução do teste:

- 2.2.1 Depositar na microplaca em duplicado (controlo da AAC), 25 μl de cada um dos ST.
- 2.2.2 Utilizar sempre o PRS e o NRS em cada série de provas. Estes soros deverão ser diluídos no próprio dia da prova em TV, em diluições sucessivas na base 10, de 1/10 a 1/640.
- 2.2.3 Controlar o SH (depositar na cúpula correspondente 75 μl de TV), a AAC do Ag (depositar 25 μl de TV na cúpula correspondente) e o complemento a 0,5 UHC, 1 UHC e 2,5 UHC (depositar 50 μl de TV em cada cúpula).
- 2.2.4 Com exceção do controlo da AAC do ST, controlo do SH e complemento, adicionar a cada cúpula 25 μl de Ag na DT 1/40.
- 2.2.5 Com exceção do controlo do SH, adicionar a cada cúpula 25 μl de complemento previamente titulado e diluído. Agitar a placa no agitador de microplacas e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ na estufa, durante 30 minutos (agitar a microplaca a meios do período de incubação).
- 2.2.6 Adicionar a cada poço 25 μl de SH sensibilizado, agitar as placas no agitador de microplacas e incubar na estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos (agitar a microplaca a meios do período de incubação).
- 2.2.7 Após centrifugação das microplacas a 125 g durante 5 minutos fazer a leitura dos resultados.
Os soros que apresentem hemólise parcial ou ausência de hemólise são selecionados para titulação. Partindo de uma alíquota do ST não diluído, preparar diluições dos soros de 1/10 a 1/640 (de acordo com esquema Tabela 2) e repetir o ensaio.

2.2. Leitura e interpretação dos resultados:

A expressão dos resultados baseia-se no grau de fixação do complemento observado na mais alta diluição em que há fixação do complemento e de acordo com a Tabela 1.

- Qualquer soro que diluído a 1/10 fixe totalmente o complemento (4+) é considerado "Positivo".
- Os soros que diluídos a 1/10 fixem parcialmente o complemento (1+, 2+ e 3+) são considerados "Duvidosos".
- Resultados esperados nos controlos:
 - Ag \rightarrow 100% haemolysis
 - C' $\frac{1}{2}$ units \rightarrow 50% haemolysis
 - C' 1 unit \rightarrow 100% haemolysis
 - C' 2,5 units \rightarrow 100% haemolysis
 - HS \rightarrow 100% inhibition of haemolysis
 - PRS \rightarrow ++++ $\frac{1}{160}$ and ++ $\frac{1}{320}$
 - NRS \rightarrow 100% haemolysis

Tabela 1. Interpretação dos resultados

% Fixação do Complemento	Expressão dos Resultados
100%	4+ / D*
75%	3+ / D
50%	2+ / D
25%	1+ / D
0%	0 / D

* D – Fator de Diluição

Tabela 2. Esquema de uma placa de titulação de soros

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
SS1	ACA	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$					A
SS2	ACA	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$					B
SS3	ACA	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$					C
SS4	ACA	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$					D
SS5	ACA	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$					E
SS6	ACA	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$					F
PRS	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$						G
NRS	$1/10$	$1/20$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	$1/320$	$1/640$	AgC	$C^{1/2}C$	$C'1C$	$C'2,5C$	HSC	H

SS1 → serum sample 1

SS2 → serum sample 2

SS3 → serum sample 3

SS4 → serum sample 4

SS5 → serum sample 5

SS6 → serum sample 6

AgC → Ag control

$C^{1/2}C$ → $C^{1/2}$ unit control

$C'1C$ → $C'1$ unit control

$C'2,5C$ → $C'2,5$ units control

HSC → HS control