

29. Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação para o parvovírus suíno

Preparação das Hemácias

A preparação das hemácias devem ser realizadas conforme a descrita para o vírus da Influenza Equina, porém utilizando hemácias de cobaios a 0,5%.

Para a hemaglutinação (HA):

- 1- Preparar PBS com 0,4% de albumina bovina;
- 2- Medir o pH do PBS + albumina: pH 7,2;
- 3- Preparar hemácias de cobaio a 0,5%;
- 4- Fazer a HA conforme o item descrito para o vírus da Influenza Equina, gotejando 25µL e utilizando o PBS com albumina.

Para a inibição da hemaglutinação (HI):

- 1- Adicionar 175µL de PBS + 0,4% de albumina bovina na linha “A”;
- 2- Adicionar 100µL de PBS + 0,4% de BSA na linha “B”;
- 3- Adicionar 75µL na linha “C”;
- 4- Adicionar 25µL nas linhas “D” até “H”;
- 5- Adicionar 25 mL de soro na linha “A”, do 1° ao 12° poço, incluindo sh, soro negativo e soros a serem testados;
- 6- Diluir 25µL de soro da linha “A” até a linha “H”;
- 7- Gotejar o vírus contendo 4 unidades hemaglutinantes, na quantidade de 25µL, da linha h/d até a d/h, do 1° ao 12° poço
- 8- Incubar 30 minutos em temperatura ambiente;
- 9- Gotejar as hemácias de cobaio diluídas a 0,5% em PBS + 0,4% de BSA da linha “D” ou “C” para testar o soro, até “H”, do 1° ao 12/ poço na quantidade de 25µL;
- 10-Incubar a 4°C durante a noite.

30. Hemaglutinação para parvovírus bovino

Preparação das Hemácias

A preparação das hemácias devem ser realizadas conforme a descrita para o vírus da Influenza Equina, porém utilizando hemácias de cobaias a 0,7%.

Para a hemaglutinação (HA):

- 1- Hemácias de cobaias a 0,7%;
- 2- Usar 4 unidades hemaglutinantes;
- 3- Do 2º poço até 12º poço colocar 25µL de PBS;
- 4- 1º poço 25µL de soro tratado sem PBS;
- 5- 2º poço 25µL de soro tratado com 0,025 mL de PBS anteriormente colocado;
- 6- Diluir do 2º ao 12º poço;
- 7- No 12º poço fica somente PBS + vírus + hemácias;
- 8- No 1º poço fica somente vírus + hemácias + soro.

31. Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação para parvovírus canino

Preparação das Hemácias

1. Dilua o sangue de suíno em solução de Alsevers: 1mL de Alsevers para cada 4mL de sangue. O sangue pode ser utilizado por até 7 dias após a coleta, se mantido em geladeira.
2. Centrifugar a suspensão de hemácias (2500 rpm/5min) para remover o Alsevers.
3. Lavar as hemácias 3 vezes com suspensão VAD pH 6.0 (2500 rpm/5min).
4. Após a última lavagem, desprezar o sobrenadante e diluir as hemácias em VAD (pH 6.0) para adicionar às placas (75µL de hemácias em 10mL de VAD).

Para a hemaglutinação (HA):

1. Utilize microplacas de 96 cavidades com fundo em “U”.
2. Adicionar 50µL de BABS (pH 9.0) em todos os orifícios da placa. Ver **Reagentes e Soluções** ao final desta técnica.
3. Normalmente o parvovírus canino tem títulos altos, então recomenda-se utilizar duas linhas para fazer as diluições. Utilizando-se a placa no sentido horizontal, cada microplaca de 96 cavidades HA serve para testar 4 amostras de vírus. Cada amostra é testada em duas linhas (A e B):
4. No primeiro orifício das linhas A, C, E e G adicionar 50µL da suspensão contendo vírus.
5. Fazer diluições seriadas na base 2 (transfira 50µL para o próximo poço) até a coluna 11, quando chegar na coluna 11 reinicie no orifício 1 da linha seguinte (B, D, F e H), diluindo novamente até a coluna 11.
6. Reserve a coluna 12 para controle de hemácias (BABS + suspensão de hemácias).

7. Adicionar em todos os orifícios da placa 50µL da suspensão de hemácias 0,75%, diluída em VAD pH 6.0.
8. Incubar na geladeira (4°C) durante a noite.
9. A maior diluição do vírus onde se observa hemaglutinação corresponde a 1 unidade hemaglutinante/50µL.
10. Para calcular 8 UHA (concentração usada na sorologia ou inibição da hemaglutinação), que serão utilizadas na HI, divide-se a diluição de 1 UHA por 8.

- Exemplo: Se a diluição limite onde ocorre HA é 1/1024, esta corresponde a 1 UHA. - Então 8 UHA será a diluição 1/128.

Para a inibição da hemaglutinação (HI):

1. Adicionar 40µL de BABS na primeira coluna (A1 a H1), a partir da segunda coluna adiciona-se 25µL de BABS.
2. Adiciona-se 10µL de soro das amostras testes na primeira fila (A1 a H1). Dilua as amostras de soro (1:5), transfira 25µL do primeiro poço para próximo e assim por diante até a coluna 11 (diluição na base 2, ou seja 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 ...)
3. Reserve a coluna 12 (E12 até H12) para os controles: controle de vírus (BABS, suspensão de vírus e hemácias) e nos orifícios A12 a D12 controle de hemácias (BABS e hemácias).
4. Adiciona-se 25µL da suspensão de vírus em toda a placa, exceto nos orifícios D12 a A12 (controle de hemácias).
5. Incubam-se as placas por 2 horas em estufa a 37°C.
6. Adiciona-se em toda a placa 25µL da suspensão de hemácias a 0,75% em VAD (pH 6);
7. Incubar na geladeira (4°C) durante a noite.
8. O título de anticorpos é dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir a hemaglutinação.

Reagentes e Soluções:

1. Solução de Alsevers (pH 6,1).

Para o ajuste do pH, usar solução de 5% ácido cítrico.

Reagentes	Quantidades
Dextrose	20,5g
Citrato de Sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8g
Cloreto de Sódio (NaCl)	4,2g
H ₂ O destilada qsp	1L

2. Soluções para preparo do Tampão VAD (pH 6.0):

2.1 Suspensão A

Reagentes	Quantidades
NaCl	17,54g
H ₂ O destilada qsp	200mL

2.2 Suspensão B:

Reagentes	Quantidades
Suspensão A	20ml
Fosfato de sódio monobásico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	16,08g
H ₂ O destilada qsp	180mL

2.3 Suspensão C

Reagentes	Quantidades
Suspensão A	100ml
Fosfato de sódio monobásico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	16,08g
H ₂ O destilada qsp	900mL

2.4 Tampão VAD (pH 6,0):

Reagentes	Quantidades
Suspensão B	125 ml
Suspensão C	875ml

3. Soluções para o preparo do BABS (pH 9.0):

3.1 Suspensão A:

Reagentes	Quantidades
NaCl	8,77g
H ₂ O destilada qsp	100mL

3.2 Suspensão B:

Reagentes	Quantidades
H ₃ BO ₃	3,1g
H ₂ O destilada qsp	100mL

3.3 Suspensão C:

Reagentes	Quantidades
NaOH	2g
H ₂ O destilada qsp	50mL

3.4 Suspensão D:

Reagentes	Quantidades
Suspensão A	80mL
Suspensão B	100 mL
Suspensão C	24mL
H ₂ O destilada qsp	1000mL

3.5 Suspensão E (pode ser estocada no congelador por 6 meses):

*Dissolver a 37°C (em banho-maria).

Reagentes	Quantidades
Suspensão D	100mL
Soroalbumina Bovina	2g

3.6 Tampão BABS (pH 9.0) – estocar no congelador:

Reagentes	Quantidades
Suspensão D	90mL
Suspensão E	10mL