

28. Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação para o vírus da influenza equina

Preparação de hemácias de galinha

1. Coletar e conservar o sangue em meio de Alsewers na proporção de 1:5 (1mL de sangue para 4 mL de Alsewers);
2. Centrifugar à 1500 rpm por 10 minutos, temperatura ambiente;
3. Desprezar soro mais Alsewers;
4. Completar com PBS, centrifugar mais 3 a 4 vezes;
5. Desprezar sobrenadante e colocar em um vidro 1mL de hemácias para 99mL de PBS (prontas para uso na HA e na HI).

Reagentes e Soluções:

1. Solução de Alsewers (pH 6.1):

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	1 litro

OBS: para o ajuste do pH, usar solução de 5% de ácido cítrico.

Para a hemaglutinação (HA):

1. Adicionar 25µL de PBS em cada poço.
2. Adicionar 25µL de antígeno no 1º poço e diluir até o 11º, assim teremos da diluição 1:2 até 1:2048.
3. Adicionar 25µL de hemácias em todos os poços.
4. Incubar 1 hora a 4°C.

5. Fazer a leitura da placa. As amostras positivas serão aquelas onde for observado a formação da aglutinação das hemácias. Amostras negativas serão visualizadas como um ponto vermelho no fundo do poço.

O teste de hemaglutinação é um teste que pode ser realizado tanto como diagnóstico (detecta a presença do vírus) como um teste realizado previamente à Inibição da Hemaglutinação, pois para este teste é necessário ter o vírus titulado.

Para tanto, deve-se fazer:

1. Realizar o teste de Hemaglutinação como o descrito acima.
2. Fazer a leitura do teste de Hemaglutinação. O maior título na HA é referente a 1 unidade hemaglutinante. Para o teste da Inibição da Hemaglutinação são necessárias 4 unidades hemaglutinantes e obtém-se este título dividindo o título da HA por 4.

Por exemplo: se o título obtido na HA foi de 64, deve-se dividir 64 por 4, que é 16. A diluição que deve ser feita com o antígeno é de 1:16, ou seja, para cada 16mL de solução do antígeno, deve-se utilizar 1mL do antígeno para 15mL de PBS. A quantidade de cada reagente pode ser diminuída, desde que proporcionalmente, ou seja, pode-se utilizar 100µL do antígeno para 1,5mL de PBS, ou como for mais conveniente.

Para a inibição da hemaglutinação (HI):

1. Adicionar 25µL de PBS em cada poço.
2. Adicionar 25µL de soro no 1º poço e diluir na base 2 até o 11º.
3. Adicionar 25µL de antígeno contendo 4 unidades hemaglutinantes do 1º até o 11º poço. Utilizar o protocolo anterior para a padronização das unidades hemaglutinantes.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos;
5. Adicionar 25µL de hemácias em todos os poços;
6. Incubar 1 hora a 4°C.

Para a inibição de material positivo:

- 1- Adicionar 25µL de PBS na placa.
- 2- Adicionar 25µL de amostra e diluir.
- 3- Adicionar 25µL de uma amostra de soro positivo com título conhecido e diluída 1:10.
- 4- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5- Acrescentar as hemácias.
- 6- Incubar 1 hora a 4°C.

OBS: deve-se fazer controle do vírus juntamente com a amostra testada.