

ANEXO III

IHA PARA PI3

Este ensayo determina la presencia de anticuerpos dirigidos contra las hemoaglutininas virales, también llamados “inhibidores de la hemoaglutinación” en sueros de animales vacunados. Antes del ensayo, los sueros sufren un tratamiento con kaolín para adsorber inhibidores inespecíficos de la hemoaglutinación que pudieran estar presentes, luego, diluciones seriadas de los sueros se enfrentan a una concentración fija de virus, establecida en 8 UHA/25 ul. La reacción se revela agregando glóbulos rojos de cobayo. Cuando en un suero existen anticuerpos específicos dirigidos a la HA viral, se formarán complejos Ag-Ac que bloquearán la hemoaglutinación e inhibirán su capacidad de aglutinar glóbulos rojos, es decir, se impide la unión del virus a los glóbulos en suspensión y consecuentemente se observa la formación de un botón rojo característico en el fondo del pocillo.

Los resultados pueden interpretarse e informarse siempre que se haya dado conformidad al ensayo. Las muestras se ensayan diluciones seriadas base 2 comenzando a partir de 5 (ver Tabla I). Se tomará como punto final de la actividad del suero (título de Ac IHA anti PI-3) a la inversa de la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. El resultado final se expresa en Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación (UIHA). La recíproca de la dilución de punto final de la actividad del suero, multiplicada por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado (8 UHA) nos resultará en el número de unidades inhibidoras de la hemoaglutinación del suero por unidad de volumen.

La presencia de reacciones IHA de diluciones inferiores a 1/10 (40-80 UIHA) se consideran NEGATIVAS.

Valores superiores a 1/80 (640 UIHA o más) representan respuesta a la vacunación.

Para cobayos vacunados (DOS (2) dosis con un intervalo de VEINTIUN (21) días): se considera como respuesta óptima a la vacuna cuando se detecta seroconversión (incremento de al menos de 1 logaritmo) entre el título de UIHA de la muestra de suero pre-vacunación y la muestra correspondiente a los 30 dpv (NUEVE (9) días post 2° dosis).

MATERIALES

- Placa de 96 wells fondo en U limpias no estériles.
- Cubetas descartables o autoclavables, limpias, no estériles.
- Tips amarillos (hasta 200 µl)
- Tips azules (hasta 1000 µl)
- Tubos plásticos de 1.8 ml tipo “eppendorf”
- Tubos cónicos de 15 ml
- Tubos cónicos de 50 ml
- Pipeta pasteur plástica
- Descarte

- Bolsas de autoclave verdes
- Papel absorbente
- Guantes de látex descartables
- Agujas 25/8
- Jeringa de 5 ml
- Algodón y alcohol

EQUIPOS

- Micropipeta hasta 200µl (tolerancia máxima admitida: 5ul)
- Micropipeta hasta 40µl (tolerancia máxima admitida: 0.4ul)
- Micropipeta hasta 1000 µl (tolerancia máxima admitida: 10ul)
- Micropipeta multicanal 8-12 hasta 5-50µl. Sin restricciones respecto a la tolerancia.
- Microcentrífuga (hasta 14.000 rpm)
- Centrífuga refrigerada (hasta 5.000 rpm)

REACTIVOS

- Virus de Trabajo:

Suspensión de PI-3, ajustado a la concentración de 8 UHA/25 ul o 16 UHA/50 ul

- Diluyente:

PBS 1 X, pH: 7.2-7.4

- Solución de Kaolín:

Kaolín 0,04g

PBS 1X 5ml

- Glóbulos rojos de cobayos (ver obtención en punto 4)
- Alsever 1X
- Sueros control: positivo y negativo
- Sueros Estándar: positivo y negativo

Preparación: Los sueros controles corresponden a pools de sueros de cobayos vacunados con

vacunas de concentración de Ag conocida. Para confeccionar los pooles se seleccionan sueros con títulos medios (320-640 UIHA) (control positivo) y o sueros de animales negativos (control negativo).

Como estándares se utilizar sueros de cobayos de título conocido, preferentemente altos (1260 UIHA) y negativos.

TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS

- Inactivar los sueros durante 30 minutos a 56°C.
- Colocar 50ul de suero en un tubo de 1.8 ml, agregar 50ul de la solución de Kaolín, homogenizar por vortex. Incubar durante 10 ± 2 minutos a temperatura ambiente (24-27°C).
- Centrifugar durante 15 ± 2 minutos a 1500 rpm.
- Tomar 50ul del sobrenadante y transferir a otro tubo con 75ul de PBS 1X y homogenizar con vortex.

(La dilución final del suero es de $1/2 * 2/5=1/5$)

- Los sueros controles y estándares positivos y negativos deben tratarse de igual manera que las muestras.

En el caso que los sueros no sean utilizados en ese momento, pueden guardarse a -20°C y analizarse dentro de la semana de tratados.

PREPARACION DE LA DILUCION DE GLOBULOS ROJOS

- Preparar, en esterilidad, una jeringa con 1 ml de anticoagulante Citrato (o Alsever 1X al medio del volumen que se necesita de glóbulos).
- Tomar muestra de sangre de un cobayo por punción cardíaca (4 ml + 1 ml anticoagulante = 5ml totales).
- Una vez finalizada la extracción, sacar la aguja de la jeringa (descartar en descarte de material corto-punzante). Este procedimiento se realiza para evitar la hemólisis de los GR.
- Colocar la sangre en un tubo cónico de 15 ml, estéril. Centrifugar a 1500 ± 200 rpm, a 4-8°C durante 5 ± 1 min.
- Eliminar la fase líquida utilizando una pipeta pasteur plástica o pipeta automática/tip de 1000ul.
- Lavado: Resuspender el paquete de glóbulos en PBS 1X y llevar a un volumen de aprox. 15 ml. Centrifugar durante 10 minutos a 1800 ± 200 rpm a 4-8°C. Realizar 2 lavados. Descartar el sobrenadante.

IMPORTANTE: En cada lavado el sobrenadante debe mantenerse límpido, la presencia de un tinte

rojizo es indicador de hemólisis y en ese caso los GR NO son aptos para su utilización en el ensayo.

La suspensión de GR debe prepararse fresca en el momento de realización del ensayo.

- Preparar la dilución de trabajo de glóbulos: Primero se realiza una dilución $\frac{1}{4}$ (1 ml de paquete de glóbulos más 3 ml de PBS 1X) y luego partiendo de esta dilución se hace una dilución $\frac{1}{40}$ (1 ml de la dil $\frac{1}{4}$ más 29 ml de PBS 1X). De este modo se obtiene la dilución final de trabajo de $\frac{1}{120}$ ó 0.8%.
- Una vez hecha la dilución de GR se procede a titular y a ajustar el Virus PI-3 a la dilución de trabajo mediante la técnica de hemoaglutinación.

TITULACION Y AJUSTE DE LA DILUCION DE TRABAJO DEL VIRUS PI-3

1. Descongelar el virus en uso, una placa fondo en U cargar 50ul de PBS 1X en 2 filas y cargar otra fila para el control de GR.
2. Agregar 50ul del virus de trabajo.
3. Realizar diluciones al medio, transfiriendo 50ul desde los pocillos 1 hasta 12.
4. Agregar 50ul de la dilución $\frac{1}{120}$ glóbulos rojos en todos los pocillos.
5. Incubar a Temperatura ambiente (20-27°C) durante 1 hora.
6. Una vez que se visualiza la formación del botón de glóbulos en la hilera de control de GR, se puede proceder a la lectura.
7. El virus debe tener un título de 16 UHA/50ul. Si el título obtenido es menor, dicha suspensión NO ES APTA PARA EL ENSAYO. Si el título viral es mayor, diluir con PBS 1X y volver a titular.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE IHA

- Colocar 25ul de PBS 1X en toda la placa excepto en fila G.
- Agregar 25ul del suero tratado en los pocillos F, G y H.

(Se pueden analizar DOCE (12) muestras por placa de la fila UNO (1) a DOCE (12) con SIETE (7) diluciones por muestra, o se pueden usar la placa apaisada, en cuyo caso se analizan OCHO (8) muestras de A a H con ONCE (11) diluciones por muestra)

- Realizar diluciones seriadas base 2, pasando 25ul, desde la fila F hasta la fila A, descartando los últimos 25ul.

Los sueros estándares se colocan en forma aleatoria entre las muestras. Los sueros controles positivos y negativos se colocan al final de todos los sueros problemas ya tratados y del mismo modo que éstos. Se deja una columna libre para realizar el control de glóbulos rojos y otra para realizar nuevamente la titulación de virus.

- Agregar 25ul de virus en la dilución establecida de uso (16 UHA/25 ul) en todas las filas, excepto en H que quedará como control de suero sin virus. Este último control cumple la función de detectar

la presencia de actividad hemoaglutinante inespecífica en los sueros problema.

- Incubar las placas con la mezcla suero-virus durante una hora a temperatura ambiente (24-27°C).
- Agregar 50ul de la suspensión de glóbulos rojos (81/120) en todas las placas.
- Incubar a temperatura ambiente hasta la formación del botón de glóbulos en la columna de control de glóbulos.

LECTURA E INTERPRETACION

La lectura se realiza por visualización directa.

ACEPTACION DEL ENSAYO (CONFORMIDAD)

Para que un ensayo se considere conforme se deben cumplir los siguientes requisitos:

- o La suspensión de virus de trabajo debe dar un título de 16 UHA/50ul (8 UIHA/25ul)
- o El botón de GR en los pocillos control debe ser sólido
- o Los sueros controles y estándares positivos deben dar el título esperado (se admite una variación de 1 dilución).
- o Los sueros controles y estándares negativos deben ser negativos.
- o Para determinar el título de una muestra, no debe observarse hemoaglutinación en el pocillo control de suero sin virus.

INTERPRETACION

Se tomará como punto final de la actividad del suero (título de Ac IHA anti PI-3) a la máxima dilución en la que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido. El resultado final se expresa en unidades inhibitoras de la hemoaglutinación (UIHA). La recíproca de la dilución de punto final de la actividad del suero, multiplicada por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado (8 UHA/25ul) resultará en el número de unidades inhibitoras de la hemoaglutinación del suero por unidad de volumen.

Para evaluación de la inmunogenicidad de vacunas en cobayos (dos dosis de un volumen correspondiente a 1/5 de la dosis bovina, administrada con un intervalo de VEINTIUN (21) días): Se considera como respuesta óptima a la vacuna cuando se detecta seroconversión (incremento de al menos de UN (1) logaritmo) entre el título de UIHA de la muestra de suero pre-vacunación (o testigo) y la muestra correspondiente a los 30 dpv (NUEVE (9) días post segunda dosis). El promedio del título de Ac IHA anti PI-3 en el sueros de los cobayos (n=5) analizados deberá ser mayor o igual a 1.50 para considerar la vacuna como APROBADA.

Tabla 1. Título de Ac IHA anti PI-3

POCILLO	Ultima Dilución que presenta IHA	Título de la muestra (UIHA/25 ul) = dil * 8	Título de la muestra (log10)
H	1	10	1
G	5	40	1,60
F	10	80	1,90
E	20	160	2,20
D	40	320	2,50
C	80	640	2,80
B	160	1280	3,10
A	320	2560	3,40