

TESTUL DE INHIBARE A HEMAGLUTINARII (IHA) IN DETECTIA ANTICORPILOR ANTI SUBTIPURILOR DE VIRUS AL INFLUENTEI AVIARE

1. INTRODUCERE

Testul de inhibare a hemaglutinarii (IHA) este folosit in identificarea subtipurii hemaglutininei (H) a virusului influentei aviare (AI) care determina caracterul seropozitiv prin detectia abilitatii anticorpilor din serul pasarii de testat sa inhibe activitatea hemaglutinanta a antigenului de referinta. Testul este utilizat la pasari cunoscute ca fiind infectate cu influenta aviara fie ca urmare a unui test serologic fata de antigenul de grup A rezultat pozitiv (e.g. imunodifuzie) sau ca rezultat al semnelor clinice.

Aceasta procedura este extrasa din Manualul OIE de Teste Diagnostic si Vaccinuri pentru Animale Terestre (www.oie.int)

Inaintea efectuarii testului IHA este necesara titrarea antigenului de referinta astfel incat sa se prepare o solutie antigen avand 4 unitati hemaglutinante (HAU)

2. ECHIPAMENT

- Pipete cu volum variabil 5 – 50 μ l
- Varfuri pipeta
- Placa de microtitrare din plastic (cu 96 godeuri in forma de V)
- Frigider $+4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Congelator $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$
- Congelator -20°C ($+2 - 10^{\circ}\text{C}$)
- Dispozitive de protectie individuala

3. REACTIVI

- Solutie salina izotonica tamponata cu fosfat (0,05 M) la pH 7,0 – 7,4 (PBS)
- PBS si albumina (0,05% w/v)
- Antigen de referinta diluat la 4 HAU per 0,025 ml in PBS*
- Suspensie 1% hematii de gaina (impachetate v/v). hematiiile se recolteaza de la cel putin 3 pui liberi de patogeni si se reunesc cu un volum egal de solutie Alsever (solutie anticoagulant). Celulele se spala de 3 ori in PBS inainte de utilizare.
- Ser de control negativ de pasare.*
- Ser de control pozitiv de pasare.*

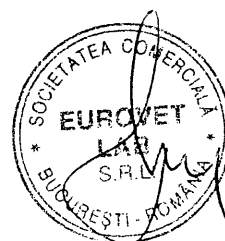
*Serurile de referinta reconstituite se pastreaza la -20°C iar antigenul reconstituit la -80°C .

4. MOD DE LUCRU



- Distribuiti 0,025 ml PBS in toate godeurile placii de microtitrare cu exceptia godeului H1 (vezi figura 1)
- Distribuiti 0,025 ml din serul de testat in toate godeurile coloanei 1 a placii de microtitrare cu exceptia godeurilor F1, G1 si H1. Adaugati 0,025 ml din serul pozitiv de control (PCS) cu titru HI cunoscut in godeul F1 si 0,025 ml din serul negativ (NCS) in godeul G1.
- Cu ajutorul unei pipete multi-canal efectuati dilutie seriala in baza 2 de-a lungul placii (randurile A pana la G). Aruncati ultimii 0,025 ml.
- Adaugati 0,025 ml suspensie antigen continand 4HAU in toata placa cu exceptia randului H.
- Adaugati 0,025 ml suspensie antigen continand 4HAU in primele doau godeuri ale randului H. Efectuati dilutie seriala in baza 2 de la H2 la H6 si aruncati ultimii 0,025 ml astfel incat concentratia antigenului sa fie 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 HAU in godeurile H1, H2, H3, H4, H5 si respectiv H6. Nota : acest control se include in fiecare placa de microtitrare.
- Adaugati 0,025 ml PBS + albumina 0,05% in toate godeurile randului H.
- Amestecati batand usor placa si incubati la +4°C timp de 40 minute sau la temperatura camerei (+20 - 24°C) timp de 30 minute.
- Adaugati 0,025 ml din suspensia 1% RBC in toate godeurile.
- Amestecati placa batand usor si incubati la +4°C timp de 40 minute sau la temperatura camerei (+20 - 24°C) timp de 30 minute.
- Cititi placile dupa 30 – 40 minute, atunci cand se stabilizeaza controlul RBC. Aceasta se realizeaza inclinand placa si observand prezenta sau absenta urmelor in forma de lacrima cu aceeasi rata ca si godeurile de control H7-H12 continand doar RBC (0,025 ml) si PBS (0,05 ml) .

Figura 1. Reprezentarea schematica a testului HI.



subtip H dar avand subtip diferit al neuraminidazei ca antigene de referinta (ex. H5N1 si H5N9; H7N1 si H7N3)

De exemplu :

O proba de ser este pozitiva fata de H5N1 la un titru de 1:256 (2^8). Daca se testeaza cu antigen H7N1 atunci poate fi observat rezultat pozitiv la inhibitie la 1:8 (2^3). Daca se testeaza cu antigen H7N3 proba trebuie sa rezulte negativa.

Anexa 1

Titrare antigenelor de referinta pentru calculul a 4 unitati hemaglutinante (HAU)

A1.1 INTRODUCERE

Inaintea efectuării testului de inhibare a hemaglutinării este necesară titrarea antigenului de referință în scopul obținerii soluției de antigen 4 HAU.

A1.2 REAGENTI

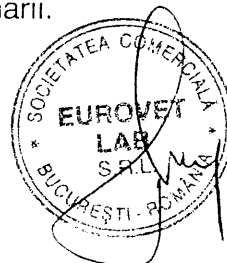
- Tampon fosfat salin isotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate și reunite de la cel puțin 3 pui liberi de patogeni într-un volum gal de soluție Alsever (soluție anti-coagulanta). Celulele se spală de trei ori în PBS înainte de utilizare. Se utilizează o suspensie 1% (celule impachetate v/v) în PBS.

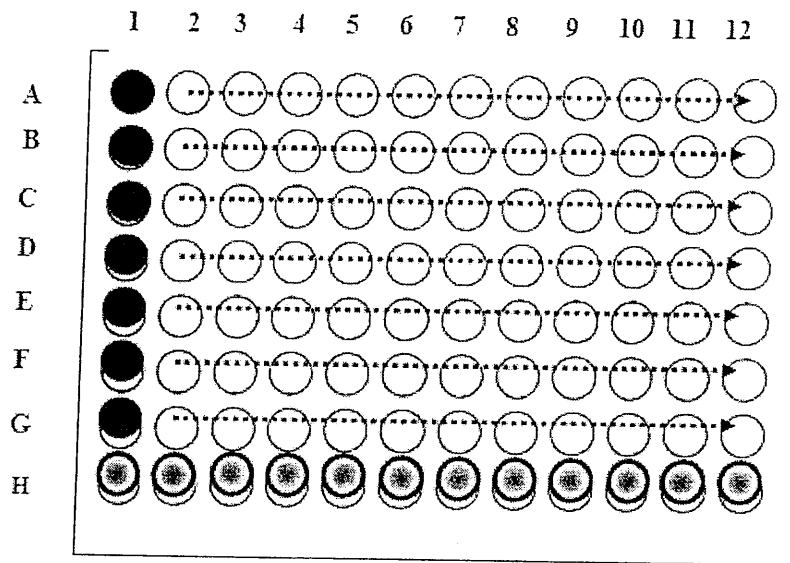
A1.3 MOD DE LUCRU

- Distribuți 0,025 ml PBS în fiecare godeu al plăcii de microtitrare de plastic (cu godeuri în forma de V) (Figura 2)
- Plasati 0,025 ml suspensie antigen de referință în primul godeu al rândului. (pot fi titrate maximum 7 antigene per placă)
- Realizați diluții seriale în baza 2 de-a lungul plăcii (de la 1:2 la 1:4096)
- Distribuți încă 0,025 ml PBS în fiecare godeu.
- Adăugați 0,025 ml suspensie hematii 1% în fiecare godeu.
- Amestecați batând ușor placă și incubați la +4°C
- Cititi plăcile după 30 – 40 minute, atunci când se stabilizează controlul RBC. Aceasta se realizează înclinând placă și observând prezența sau absența urmelor în forma de lacrimă . Godeurile fără hemaglutinare trebuie să prezinte curgere cu aceeași rată ca și celulele de control fără antigen.
- Titru HA reprezintă diluția cea mai mare care determină hemaglutinare a hematiilor. Diluția poate fi privită ca o unitate HA (HAU).

De exemplu : dacă titru HA obținut este 1:512 (și anume 1 HAU), valoarea pentru 4 HAU poate fi obținută împărțind acel titru la 4 , adică $512/4 = 128$. O diluție de 1:128 a antigenului de referință trebuie utilizată în testul de inhibare a hemaglutinării.

Figura 2. Reprezentare schematică a testului de inhibare a hemaglutinării.

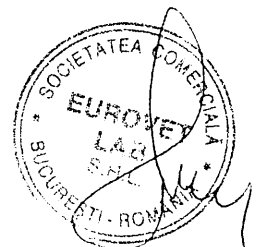




● = Reference Antigen

⊗ = RBC Control

.....▶ = serial 2-fold dilution



Istituto Zooprofilattico delle Venezie
OIE/FAO Laboratory for AI and NDV
Antigen H7N7 Batch 10/11
INACTIVATED Expiry 10/2016
Resuspend in 1 mL distilled water
Storing conditions $T \leq +4$ °C

Institutul Zooprofilattico din Venetia
Laboratorul OIE/FAO pentru AI și NDV
Antigen H7N7 Lotul 10/11
INACTIVAT Expira 10/2016
Reconstituit în 1 ml. apă distilată
Condiții de depozitare $T \leq +4$ °C

