



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 subtipului 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 $-20^{\circ}\text{C} (+2 - 10)^{\circ}\text{C}$
- Dispozitive de protectie individuala

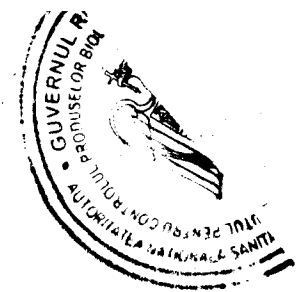
3. REACTIVI

- 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 .

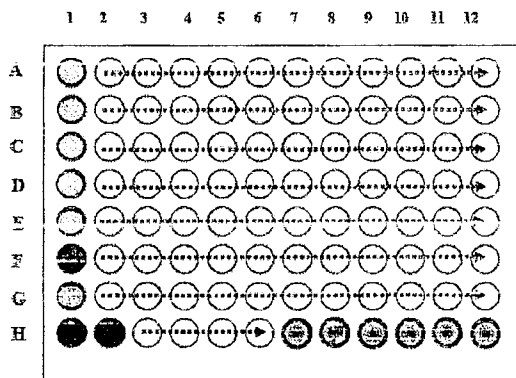
4. MOD DE LUCRU

- 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 efectuați diluție serială în baza 2 de-a lungul plăcii (randurile A până la G). Aruncați ultimii 0,025 ml.
- Adăugați 0,025 ml suspensie antigen conținând 4HAU în toată placa cu excepția randului H.
- Adăugați 0,025 ml suspensie antigen conținând 4HAU în primele două godeuri ale randului H. Efectuați diluție serială în baza 2 de la H2 la H6 și aruncați ultimii 0,025 ml astfel încât concentrația antigenului să fie 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 HAU în godeurile H1, H2, H3, H4, H5 și respectiv H6. Nota: acest control se include în fiecare placă de microtitrare.
- Adăugați 0,025 ml PBS + albumina 0,05% în toate godeurile randului H.
- Amestecați batând ușor placa și incubați la +4°C timp de 40 minute sau la temperatura camerei (+20 - 24°C) timp de 30 minute.
- Adăugați 0,025 ml din suspensia 1% RBC în toate godeurile.
- Amestecați placa batând ușor și incubați la +4°C timp de 40 minute sau la temperatura camerei (+20 - 24°C) timp de 30 minute.
- Citiți plăcile după 30 – 40 minute, atunci când se stabilizează controlul RBC. Aceasta se realizează înclinând placa și observând prezența sau absența urmelor în forma de lacrimă cu aceeași rată ca și godeurile de control H7-H12 conținând doar RBC (0,025 ml) și PBS (0,05 ml).

Figura 1. Reprezentarea schematică a testului HI.



- = Test serum
 - = Reference Antigen (4HAU)
 - ⊙ = Positive control serum
 - ⊙ = RBC control
 - ⊙ = Negative control serum (NCS)
 - = serial 2-fold dilution
- x-Ovo Limited, Thomson Cooper

5. INTERPRETAREA REZULTATELOR

- Plăcile se citesc prin înclinare și observarea prezenței (și anume inhibiția hemaglutinării de către ser = rezultat pozitiv) sau absenței (și anume lipsa inhibiției a hemaglutinării = rezultat negativ) urmelor în forma de lacrimă cu același aspect ca și godeurile de control H7 – H12.



- Titrul IH reprezintă cea mai mare diluție a antiserului care determină inhibarea completă a activității hemaglutinante a antigenului de referință 4 HAU.
- O probă este considerată pozitivă dacă inhibă activitatea hemaglutinantă a 4HAU la un titru de cel puțin 1:16 (2^4)
- Validitatea rezultatelor depinde de obținerea unui titru mai mic de 2^3 pentru 4HAU cu ser de control negativ (NCS) și un titru la distanță de o diluție a titrului cunoscut al serului de control pozitiv (PCS).
- Hemaglutinarea completă trebuie să se observe în primele trei godeuri ale rândului H (H1 – H3), hemaglutinare parțială (jumătate de picătură) în rândul H4 și lipsa hemaglutinării în rândurile H5 și H6 astfel încât testul să fie considerat valid.

Nota: În testul de inhibare a hemaglutinării se poate observa un grad redus de reactivitate încrucișată cu alte subtipuri H datorită omologiei cu antigenul neuraminidazei. În general această reactivitate încrucișată nu este mai mare de 1:16 (2^4). Pentru a evita erorile de interpretare datorate acestei reactivități încrucișate se recomandă să se utilizeze cel puțin două antigene ale aceluiași subtip H dar având subtip diferit al neuraminidazei ca antigene de referință (ex. H5N1 și H5N9; H7N1 și H7N3)

De exemplu :

O probă de ser este pozitivă față de H5N1 la un titru de 1:256 (2^8). Dacă se testează cu antigen H7N1 atunci poate fi observat rezultat pozitiv la inhibiție la 1:8 (2^3). Dacă se testează cu antigen H7N3 proba trebuie să rezulte negativă.

Anexa 1

Titarea antigenelor de referință pentru calculul a 4 unități hemaglutinante (HAU)

A1.1 INTRODUCERE

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

A1.2 REAGENȚI

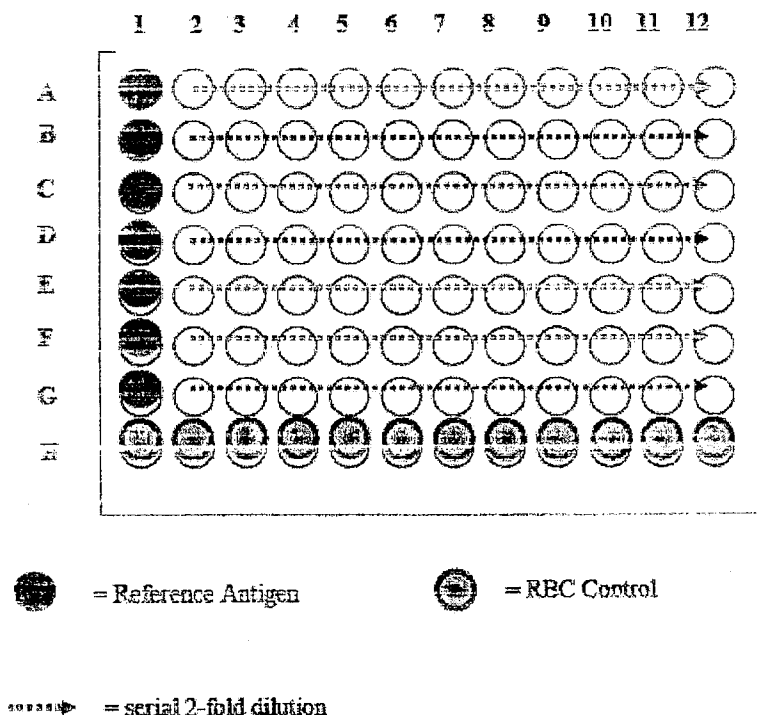
- Tampon fosfat salin isotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate și reunite de la cel puțin 3 pui liberi de patogeni într-un volum gal de soluție Alsever (soluție anti-coagulantă). Celulele se spală de trei ori în PBS înainte de utilizare. Se utilizează o suspensie 1% (celule impachetate 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 formă 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.
- Aadaugați 0,025 ml suspensie hematii 1% în fiecare godeu.


- Amestecați batând ușor placa și incubati la +4°C
- Citiți placile după 30 – 40 minute, atunci când se stabilizează controlul RBC. Aceasta se realizează înclinând placa 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.
- Titrul HA reprezintă diluția cea mai mare care determină hemaglutinare a hematilor. Diluția poate fi privită ca o unitate HA (HAU).
De exemplu: dacă titrul 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.




Appendix 4 – Labels for Antigen H5N1

Appendix 4 – Labels

 Istituto Zooprofilattico delle Venezie
OIE/FAO Laboratory for AI and ND
Antigen H5N1 Batch 1/20
INACTIVATED Expiry 04/2025
Resuspend in 1 mL distilled water
Storing conditions $T \leq +4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Anexa 4 – Traducere etichete

 Institutul Zooprofilatic din Veneția
Laborator OIE/FAO pentru AI și ND
Antigen H5N1 Lotul 1/20
INACTIVAT Valabilitate 04/2025
Reconstituit în 1 mL apă distilată
Condiții de depozitare: $T \leq +4\text{ }^{\circ}\text{C}$

