

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

### 1. INTRODUCERE

Testul de inhibare a hemaglutinării (IHA) este folosit în identificarea subtipurii hemaglutininei (H) a virusului influentei aviare (AI) care determină caracterul seropozitiv prin detectia abilității anticorpilor din serul pasării de testat să inhibe activitatea hemaglutinantă a antigenului de referință. Testul este utilizat la pasări cunoscute ca fiind infectate cu influența aviară fie ca urmare a unui test serologic față de antigenul de grup A rezultat pozitiv (e.g. imunodifuzie) sau ca rezultat al semnelor clinice.

Această procedură este extrasă din Manualul OIE de Teste Diagnostic și Vaccinuri pentru Animale Terestre ([www.oie.int](http://www.oie.int)).

Înainte de efectuarea testului IHA este necesară titrarea antigenului de referință astfel încât să se prepare o soluție antigen având 4 unități hemaglutinante (HAU)

### 2. ECHIPAMENT

- Pipete cu volum variabil 5 – 50  $\mu$ l
- Varfuri pipeta
- Placa de microtitrare din plastic (cu 96 godeuri în formă 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 protecție individuală

### 3. REACTIVI

- Soluție salină izotonică tamponată cu fosfat (0,05 M) la pH 7,0 – 7,4 (PBS)
- PBS și albumină (0,05% w/v)
- Antigen de referință diluat la 4 HAU per 0,025 ml în PBS\*
- Suspensie 1% hematii de găină (impachetate v/v). hematii se recoltează de la cel puțin 3 pui liberi de patogeni și se reunesc cu un volum egal de soluție Alsever (soluție anticoagulant). Celulele se spală de 3 ori în PBS înainte de utilizare.
- Ser de control negativ de pasare.\*
- Ser de control pozitiv de pasare.\*

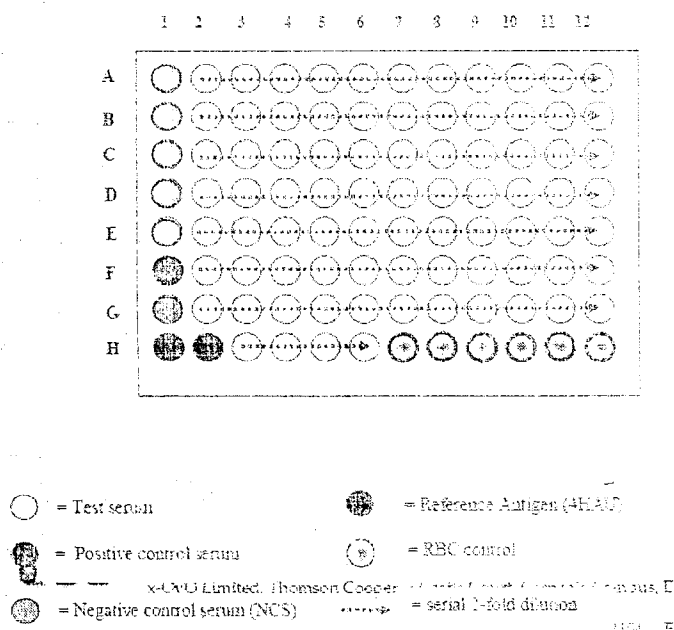
\*Serurile de referință reconstituite se păstrează la  $-20^{\circ}\text{C}$  iar antigenul reconstituit la  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4. MOD DE LUCRU

- Distribuți 0,025 ml PBS în toate godeurile plăcii de microtitrare cu excepția godeului H1 (vezi figura 1)
- Distribuți 0,025 ml din serul de testat în toate godeurile coloanei 1 a plăcii de microtitrare cu excepția godeurilor F1, G1 și H1. Adăugați 0,025 ml din serul pozitiv de control (PCS) cu titru HI cunoscut în godeul F1 și 0,025 ml din serul negativ (NCS) în 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 doua 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 + aibumina 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.



## 5. INTERPRETAREA REZULTATELOR

- Placile se citesc prin inclinare si observarea prezentei (si anume inhibitia hemaglutinarii de catre ser = rezultat pozitiv) sau absentei (si anume lipsa inhibitie a hemaglutinarii = rezultat negativ) urmelor in forma de lacrima cu aceleasi aspect ca si 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 ca 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**

Titrarea 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**

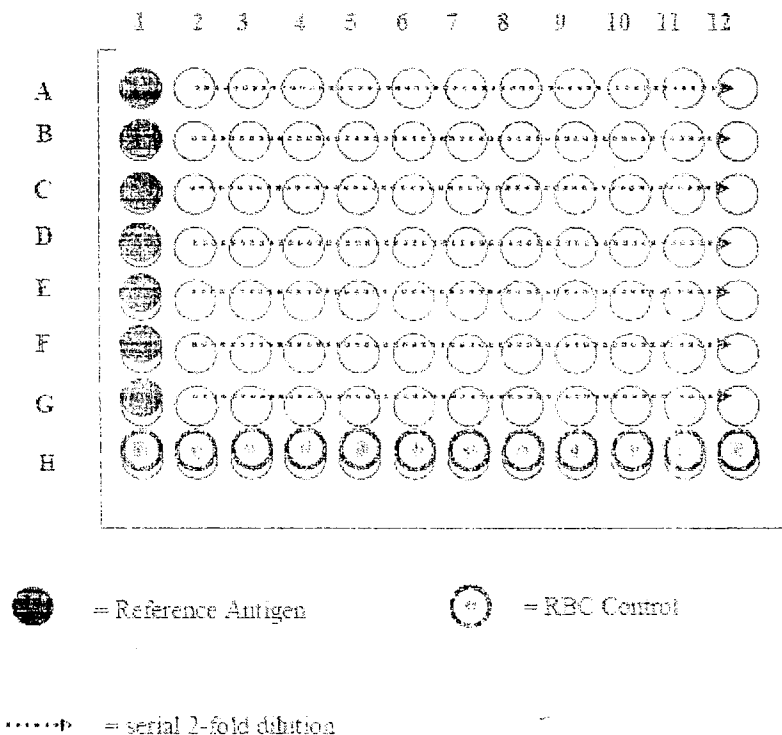
- Tampon fosfat salin izotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate și reunite de la cel puțin 3 pulberi liberi de patogeni într-un volum gal de soluție Alsever (soluție anti-coagulantă). Celulele se spală de trei ori în PBS înainte de utilizare. Se utilizează o suspensie 1% (celule împachetate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

- Amestecati batand usor placa si incubati la +4°C
- Cititi placiile 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. Godeurile fara hemaglutinare trebuie sa prezinte curgere cu aceeași rata ca și celulele de control fara antigen.
- Titrul HA reprezintă dilutia cea mai mare care determina hemaglutinare a hematiilor. Dilutia poate fi privita ca o unitate HA (HAU).  
De exemplu: daca titrul HA obtinut este 1:512 (și anume 1 HAU), valoarea pentru 4 HAU poate fi obtinuta impartind acel titru la 4, adica  $512/4 = 128$ . O dilutie de 1:128 a antigenului de referinta trebuie utilizata in testul de inhibare a hemaglutinarii.

Figura 2. Reprezentare schematica a testului de inhibare a hemaglutinarii.



ETICHETA ANTIGEN H7N7



Istituto Zooprofilattico delle Venezie

OIE/FAO Laboratory for AI and ND

Antigen H7N7 Batch 8/19

INACTIVATED Expiry 04/2024

Resuspend in 1 mL distilled water

Storing conditions  $T \leq +4^{\circ}\text{C}$



Istituto Zooprofilattico delle Venezie

OIE/FAO Laboratory for AI and ND

Antigen H7N7 Lot 8/19

INACTIVAT Data expirare 04/2024

Restituit in 1 ml apa distilata

Conditii de depozitare  $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

