



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°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). hematii 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.*

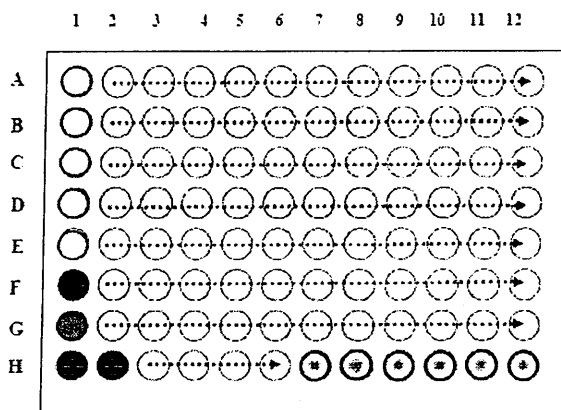
*Serurile de referinta reconstituite se pastreaza la -20°C iar antigenul reconstituit la -80°C .

4. MOD DE LUCRU



- 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 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 incubati 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 incubati 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
 — = x-ovo Limited, Thomson Cooper = serial 2-fold dilution
 ● = Negative control serum (NCS)

5. INTERPRETAREA REZULTATELOR

- Placile se citesc prin inclinare si observarea prezentei (si anume inhibitia hemaglutinarii de catre ser = rezultat pozitiv) sau absenta (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 reprezinta cea mai mare dilutie a antiserului care determina inhibarea completa a activitatii hemaglutinante a antigenului de referinta 4 HAU.
- O proba este considerata pozitiva daca inhiba activitatea hemaglutinanta a 4HAU la un titru de cel putin 1:16 (2^4)
- Validitatea rezultatelor depinde de obtinerea unui titru mai mic de 2^3 pentru 4HAU cu ser de control negativ (NCS) si un titru la distanta de o dilutie a titrului cunoscut al serului de control pozitiv (PCS).
- Hemaglutinarea completa trebuie sa se observe in primele trei godeuri ale randului H (H1 – H3), hemaglutinare partiala (jumatate de picatura) in randul H4 si lipsa hemaglutinarii in randurile H5 si H6 astfel incat testul sa fie considerat valid.

Nota : In testul de inhibare a hemaglutinarii se poate observa un grad redus de reactivitate incrucisata cu alte subtipuri H datorita omologiei cu antigenul neuraminidazei. In general aceasta reactivitate incrucisata nu este mai mare de 1:16 (2^4). Pentru a evita erorile de interpretare datorate acestei reactivitati incrucisate se recomanda sa se utilizeze cel putin doua antigene ale aceluasi



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 efectuarii testului d einhibare a hemaglutinarii este necesara titrarea antigenului de referinta in scopul obtinerii solutiei de antigen 4 HAU.

A1.2 REAGENTI

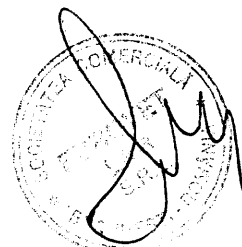
- Tampon fosfat salin isotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate si reunite de la cel putin 3 pui liberi de patogeni intr-un volume gal de solutie Alsever (solutie anti-coagulanta). Celulele se spala de trei ori in PBS inainte de utilizare. Se utilizeaza o suspensie 1% (cellule impachetate v/v) in PBS.

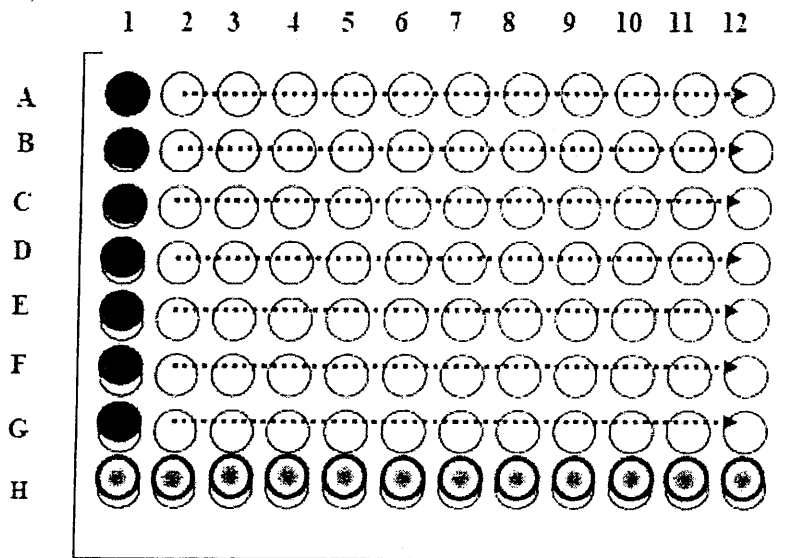
A1.3 MOD DE LUCRU

- Distribuiti 0,025 ml PBS in fiecare godeu al placii de microtitrare de plastic (cu godeuri in forma de V) (Figura 2)
- Plasati 0,025 ml suspensie antigen de referinta in primul godeu al randului. (pot fi titrate maximum 7 antigene per placa)
- Realizati dilutii seriale in baza 2 de-a lungul placii (de la 1:2 la 1:4096)
- Distribuiti inca 0,025 ml PBS in fiecare godeu.
- Adaugati 0,025 ml suspensie hematii 1% in fiecare godeu.
- Amestecati batand usor placa si incubati la +4°C
- 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 . Godeurile fara hemaglutinare trebuie sa prezinte curgere cu aceeasi rata ca si celulele de control fara antigen.
- Titrul HA reprezinta 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 (si 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 d einhibare a hemaglutinarii.

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





= Reference Antigen



= RBC Control



= serial 2-fold dilution

SER NEGATIV -SPF

Istituto Zooprofilattico delle Venezie
OIE/FAO Laboratory for AI and NDV
NEGATIVE SERUM
Batch 5/09 Expiry 11/2014
Resuspend in 1 mL distilled water
Storing conditions $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

Institutul Zooprofilattico din Veneția
Laboratorul OIE/FAO pentru AI și NDV
SER NEGATIV
Lotul 5/09 Expiră 11/2014
Reconstituiți în 1 ml apă distilată
Condiții de depozitare $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

