

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). 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.*

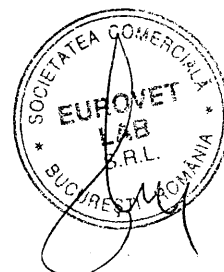
*Serurile de referinta reconstituite se pastreaza la -20°C iar antigenul reconstituit la -80°C .

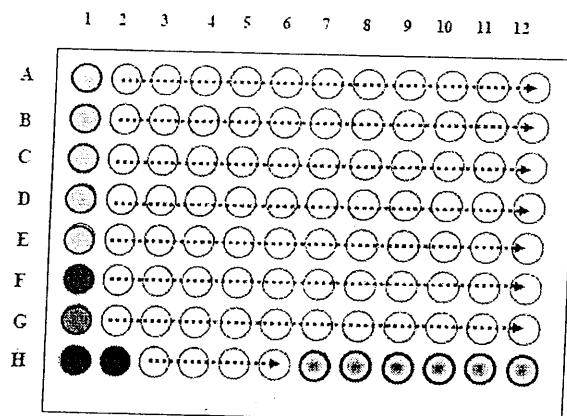
4. MOD DE LUCRU



- 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 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 + 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 aceeaasi 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.



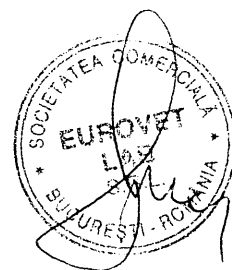


○ = Test serum ● = Reference Antigen (4HAU)
 ● = Positive control serum ○ = RBC control
 x-OxO Limited, Thomson Cooper, 21 North Street, Cambridge, UK
 ● = Negative control serum (NCS) = serial 2-fold dilution

5. INTERPRETAREA REZULTATELOR

- Placile se citesc prin inclinare și observarea prezentei (și anume inhibiția hemaglutinării de către ser = rezultat pozitiv) sau absenței (și anume lipsa inhibiției a hemaglutinării = rezultat negativ) urmelor în formă de lacrimă cu același aspect ca și godeurile de control H7 – H12.
- Titlul 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 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 de inhibare a hemaglutinarii este necesara titrarea antigenului de referinta in scopul obtinerii solutiei de antigen 4 HAU.

A1.2 REAGENTI

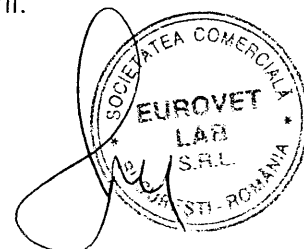
- Tampon fosfat salin isotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate si reunite de la cel putin 3 pui liberi de patogeni intr-un volume gal de solutie Alsever (solutie anti-coagulanta). Celulele se spala de trei ori in PBS inainte de utilizare. Se utilizeaza o suspensie 1% (cellule impachetate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

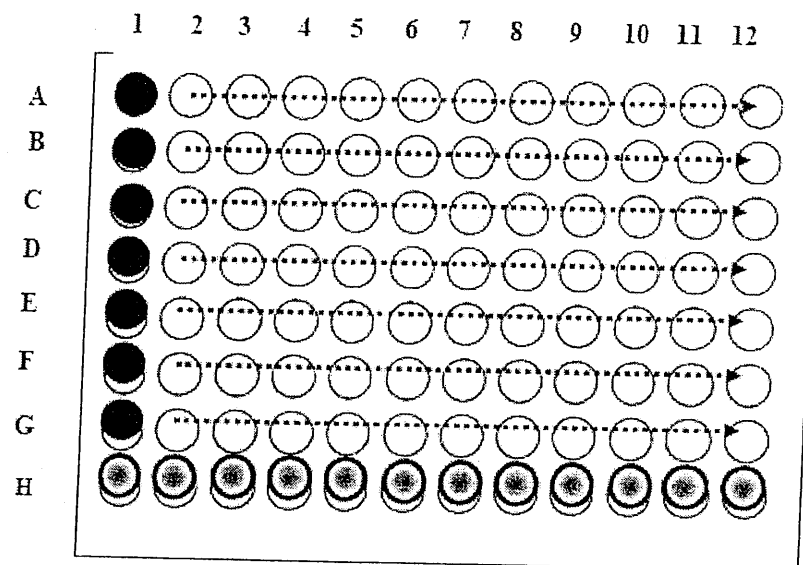
A1.3 MOD DE LUCRU

- 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.

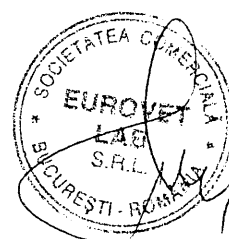




● = Reference Antigen

⊗ = RBC Control

.....→ = serial 2-fold dilution



Istituto Zooprofilattico delle Venezie
OIE/FAO Laboratory for AI and NDV
SERUM H7N7
Batch 1/07 Expiry 10/2015
Resuspend in 1 mL distilled water
Storing conditions $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

Institutul Zooprofilattico din Venetia
Laboratorul OIE/FAO pentru AI si NDV
SER H7N7
Lotul 1/07 Expira 10/2015
Reconstituit in 1 ml. apa distilata
Conditii de depozitare $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

