



TESTUL DE INHIBARE A HEMAGLUTINĂRII (IHA) ÎN DETECTIA ANTICORPILOR ANTI SUBTIPURILOR DE VIRUS AL INFLUENȚEI AVIARE

1. INTRODUCERE

Testul de inhibare a hemaglutinării (IHA) este folosit în identificarea subtipurii hemaglutininei (H) a virusului influenței 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).

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 μ l
- Varfuri pipeta
- Placă de microtitrare din plastic (cu 96 godeuri în formă de V)
- Frigidier $+4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 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). Hematiile se recolectează 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.*

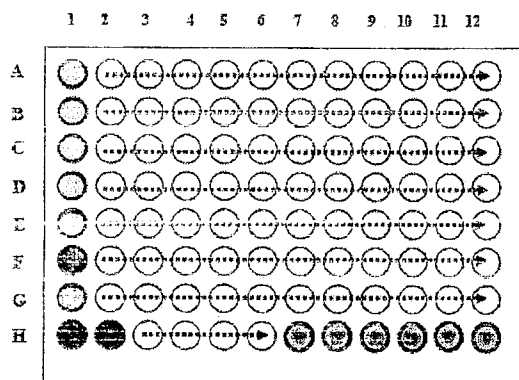
*Serurile de referință reconstituite se păstrează la -20°C iar antigenul reconstituit la -80°C .

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 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 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.



- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| = Test serum | = Reference Antigen (4HAU) |
| = Positive control serum | = RBC control |
| = Negative control serum (NCS) | = serial 2-fold dilution |
- x-Ovo Limited, Thomson Cooper, 1100 North Street, Columbus, IN 47203, U.S.A.

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 aceiasi aspect ca si godeurile de control H7 – H12.



- Titrul **HI** 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 (jumătate de picatura) in randul H4 si lipsa hemaglutinării in randurile H5 si H6 astfel incat testul sa fie considerat valid.

Nota: In testul de inhibare a hemaglutinării 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 aceluiasi 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 necesara titrarea antigenului de referinta in scopul obtinerii solutiei de antigen 4 HAU.

A1.2 REAGENTI

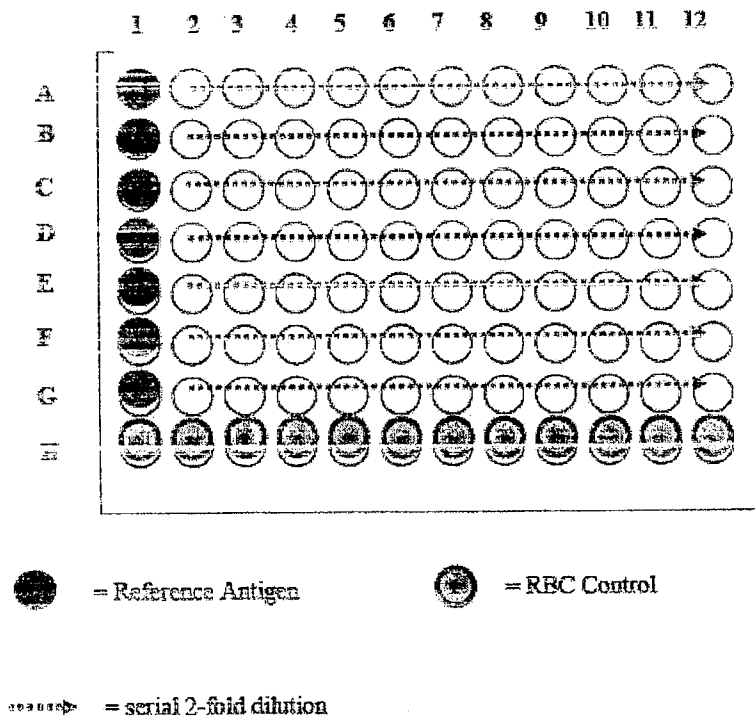
- Tampon fosfat salin isotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate si reunite de la cel putin 3 pui liberi de patogeni intr-un volume gal de solutie Alsever (solutie anti-coagulanta). Celulele se spala de trei ori in PBS inainte de utilizare. Se utilizeaza o suspensie 1% (celule impachetate 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.
- Aadaugati 0,025 ml suspensie hematii 1% in fiecare godeu.


- Amestecați batând ușor placa și incubati la +4°C
- 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. Godeurile fără hemaglutinare trebuie să prezinte curgere cu aceeași rată ca și celele de control fără antigen.
- Titrul HA reprezintă diluția cea mai mare care determină hemaglutinare a hematiilor. 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 Antiserum H5N1

Appendix 4 – Labels

 Istituto Zooprofilattico delle Venezie
OIE/FAO Laboratory for AI and ND

Serum H5N1 Batch 1/18
Expiry 07/2024
Resuspend in 1 mL distilled water
Storing conditions $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

Anexa 4 – Traducere etichete

 Institutul Zooprofilatic din Veneția
Laborator OIE/FAO pentru AI și ND

Ser Pozitiv H5N1 Lotul 1/18
Valabilitate 07/2024
Reconstituit în 1 mL apă distilată
Condiții de depozitare: $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

