



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

### 1. INTRODUCERE

Testul de inhibare a hemaglutinării (IHA) este folosit în identificarea subtipurilor 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 aviara 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)**

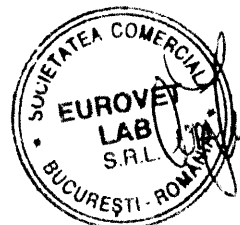
### 2. ECHIPAMENT

- Pipete cu volum variabil 5 – 50  $\mu$ l
- Varfuri pipeta
- Pipete
- Placă 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 albumina (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). hematiiile 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.\*

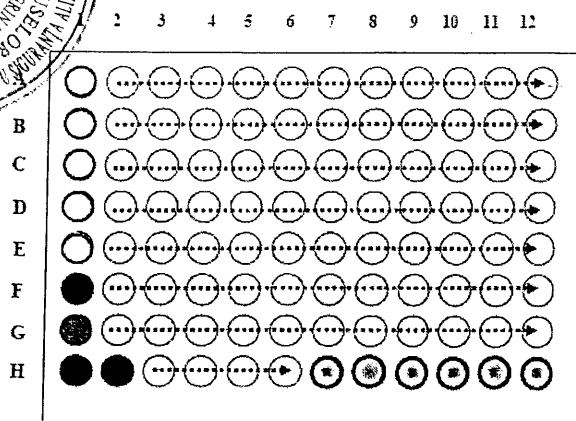
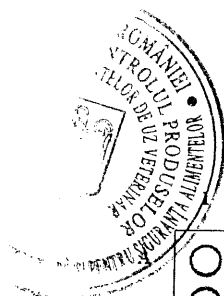
\*Serurile de referință reconstituite se păstrează la  $-20^{\circ}\text{C}$  iar antigenul reconstituit la  $-80^{\circ}\text{C}$ .



#### 4. MOD DE LUCRU

- 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 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.



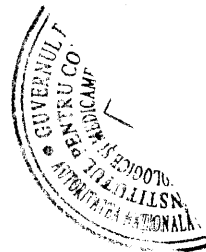
- = Test serum      ● = Reference Antigen (4HAU)
- = Positive control serum      ⊗ = RBC control
- = Negative control serum (NCS)      .....→ = serial 2-fold dilution
- x-Oxoid Limited, Thomson Cooper, 27 The Quadrant, Basingstoke, Hampshire, UK

## 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.
- 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 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 d einhibare a hemaglutinării este necesara titrarea antigenului de referinta in scopul obtinerii solutiei de antigen 4 HAU.

### A1.2 REAGENTI

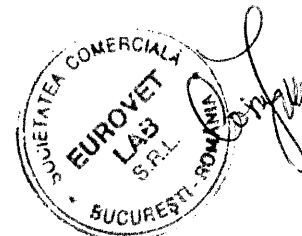
- Tampon fosfat salin isotonic ( 0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate si reunite de la cel putin 3 pui liberi de patogeni intr-un volume gal de solutie Alsever ( solutie anti-coagulanta). Celulele se spala de trei ori in PBS inainte de utilizare. Se utilizeaza o suspensie 1% ( cellule impachetate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

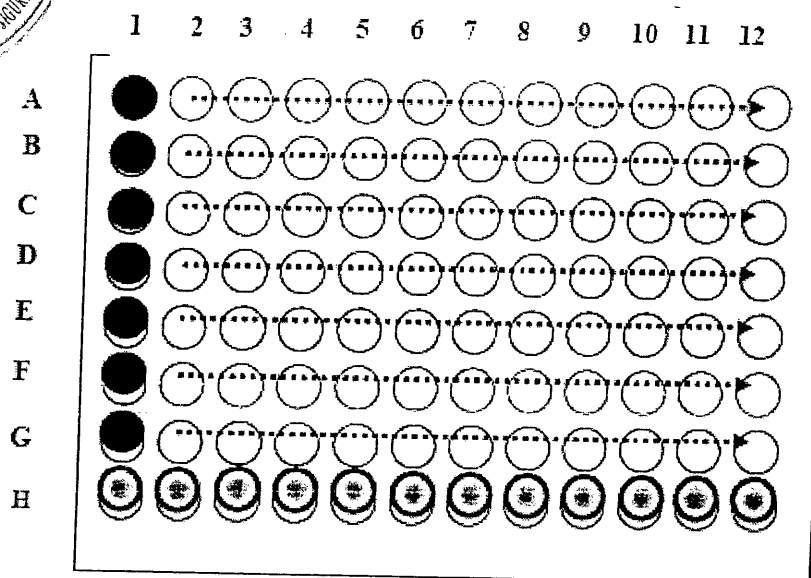
### A1.3 MOD DE LUCRU

- 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  $+4^{\circ}\text{C}$
- 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 hemaglutinării.

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





= Reference Antigen



= RBC Control



= serial 2-fold dilution



ETICHETA PRODUCATOR SER POZITIV H5N8

Istituto Zooprofilattico delle Venezie  
OIE/FAO Laboratory for AI and NDV  
SERUM H5N8  
Batch 1/15 Expiry 03/2020  
Resuspend in 1 mL distilled water  
Storing conditions  $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

TRADUCERE ETICHETA PRODUCATOR SER  
POZITIV H5N8

Institutul Zooprofilatic din Venetia  
Laborator OIE/FAO pentru AI si NDV  
SER POZITIV H5N8  
Lotul 1/15 Termen de valabilitate: 03/2020  
Reconstituit in 1 mL apa distilata  
Conditii de depozitare:  $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

