

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 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)

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 µl
- Vârful pipeta
- Placă de microtitrare din plastic (cu 96 godeuri în formă de V)
- Frigider +4°C ± 3°C
- Congelator -80°C ± 10°C
- Congelator -20°C (+2 – 10)°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 (împachetate v/v). Hematiile se recoltează de la cel puțin 3 pui liberi de patogene și se reunesco cu un volum egal de soluție Alsever (soluție anticoagulantă). Celulele se spală de 3 ori în PBS înainte de utilizare.
- Ser de control negativ de pasare.*
- Ser de control pozitiv de pasare.*

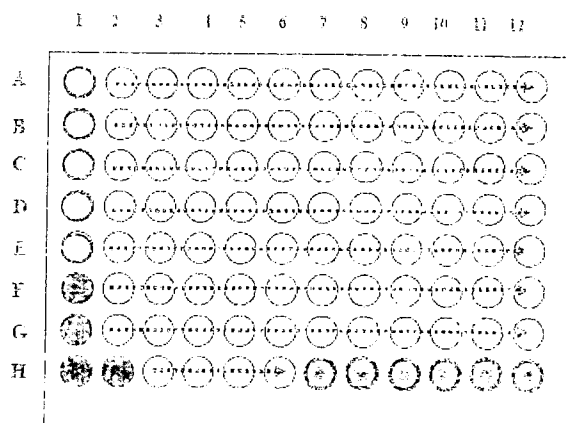
*Serurile de referință reconstituite se păstrează la -20°C iar antigenul reconstituit la -80°C

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 H1 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 rândului H.
- Adăugați 0,025 ml suspensie antigen conținând 4HAU în primele două godeuri ale rândului 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. Notă: acest control se include în fiecare placă de microtitrare.
- Adăugați 0,025 ml PBS + albumina 0,05% în toate godeurile rândului 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 inclinand 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

⊗ = Negative control serum (NCS)

..... = serial 2-fold dilution

5. INTERPRETAREA REZULTATELOR

- Plăcile se citesc prin inclinare și observarea prezenței (și anume inhibiția hemaghiutnării de către sor = rezultat pozitiv) sau absenței (și anume lipsa inhibiției a hemaghiutnării = rezultat negativ) urmelor în forma 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 hemaglutinanta 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 picături) 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 H7N2)

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 1.6 (2^3). Dacă se testează cu antigen H7N3 proba trebuie să rezulte negativă.

Anexa 1

Titrare antigenelor de referință pentru calculul a 4 unități hemaglutinante (HAU)

A1.1 INTRODUCERE

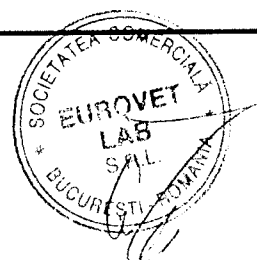
Înainte de efectuarea testului de inhibare a hemaglutinării este necesară titrarea antigenului de referință în scopul obținerii soluției de antigen 4 HAU.

A1.2 REAGENTI

- Tampon fosfat salin izotonic (0,05 M) pH 7,0 – 7,4.
- Hematii (RBC) colectate și reunite de la cel puțin 3 pui 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.

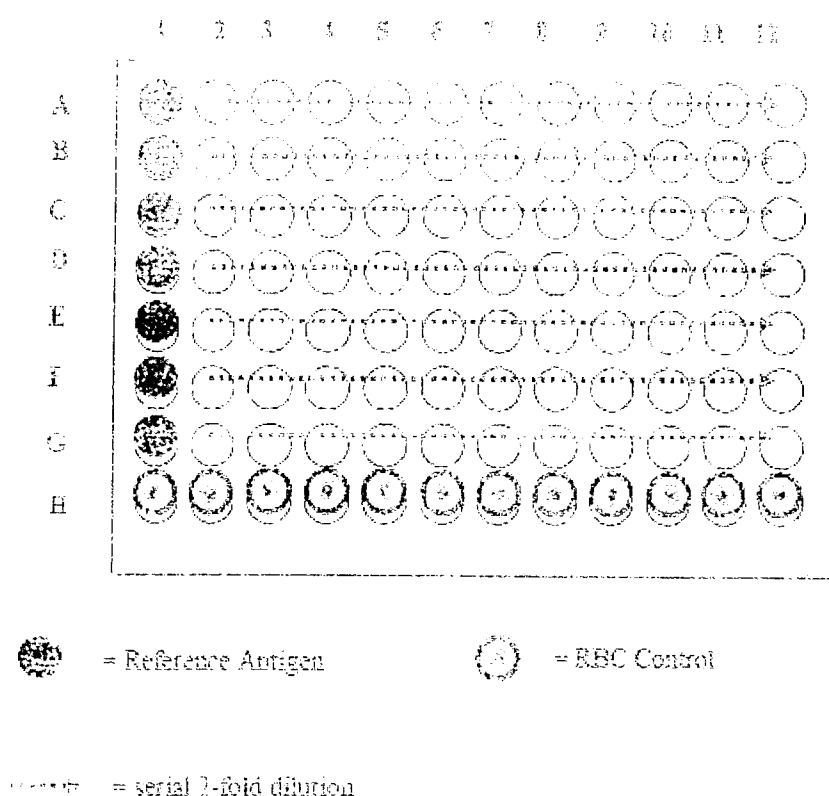
A1.3 MOD DE LUCRU

- Distribuți 0,025 ml PBS în fiecare godeu al plăcii de microtitrare de plastic (cu godeuri în forma de V) (Figura 2)
- Plasati 0,025 ml suspensie antigen de referință în primul godeu al rândului. (poi 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.



- Amestecați batând ușor placa și incubați 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 celulele 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



Etichete producător

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

Serum H7N7 Batch 1/11
Expiry 03/2020
Resuspend in 1 mL distilled water
Storage conditions: $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

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

Antigen H7N7 Batch 16/11
INACTIVATED Expiry 07/2021
Resuspend in 1 mL distilled water
Storage conditions: $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

Traducere etichete

ISV Institutul Zooprofilatic din Venetia
Laborator OIE/FAO pentru AI si NDV

Ser Pozitiv H7N7 Lotul 1/11
Termen de valabilitate: 03/2020
Reconstituit in 1 mL apa distilata
Conditii de depozitare: $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

ISV Institutul Zooprofilatic din Venetia
Laborator OIE/FAO pentru AI si NDV

Antigen H7N7 Lotul 16/11
Termen de valabilitate: 07/2021
Reconstituit in 1 mL apa distilata
Conditii de depozitare: $T \leq +4^{\circ}\text{C}$

